

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN
ENDOTELIAL MEDIANTE
FLUJOMETRÍA POR LÁSER DOPPLER
EN PACIENTES CON OBESIDAD
MÓRBIDA Y SÍNDROME DE CUSHING
CURADOS**

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL MEDIANTE FLUJOMETRÍA POR LÁSER
DOPPLER EN PACIENTES CON OBESIDAD MÓRBIDA Y SÍNDROME DE CUSHING
CURADOS**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE ENFERMERÍA

DEPARTAMENTO DE ENFERMERÍA

DOCTORANDO

ANTONIO CERVERA BARAJAS

DIRECTORES

DAVID CANO GONZÁLEZ
JUAN RAMÓN CASTILLO FERRANDO

TUTOR
MANUEL JESÚS GARCÍA MARTÍNEZ

SEVILLA, MAYO 2017

Este trabajo se ha realizado en la Unidad de Ensayos Clínicos del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Unidad de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Virgen del Rocío y en el laboratorio de Enfermedades Endocrinas del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS).

Este trabajo se podido realizar gracias a dos proyectos financiados:

- Riesgo cardiovascular en pacientes con obesidad mórbida: Impacto de la pérdida de peso (2009-2011). REF: PI0269. Agencia Financiadora: Servicio Andaluz de Salud (SAS)
- Estudio de las secuelas de pacientes con síndrome de Cushing (2010-2013). REF: PS09/01165. Agencia Financiadora: Fondos FIS. Instituto de Salud Carlos III.

El profesor Dr. Juan Ramón Castillo Ferrando, catedrático de Farmacología de la Universidad de Sevilla (Departamento de Farmacología, Pediatría y Radiología), el Dr. David Alonso Cano, Investigador del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), y el tutor profesor Dr. Manuel Jesús García Martínez del Departamento de Enfermería de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado: **“EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL MEDIANTE FLUJOMETRÍA POR LÁSER DOPPLER EN PACIENTES CON OBESIDAD MÓRBIDA Y SÍNDROME DE CUSHING CURADOS”** que presenta D. Antonio Cervera Barajas para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado en la Unidad de ensayos clínicos Fase I-II del hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, en la Unidad de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Virgen del Rocío y en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), bajo la dirección del profesor Dr. Juan Ramón Castillo Ferrando y el Dr. David Alonso Cano, y la tutorización del profesor Dr. Manuel Jesús García Martínez, cumpliendo los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como tesis doctoral.

Y para que conste expedimos y firmamos la presente certificación en Sevilla a Mayo de 2017.

Dr. D. David Alonso Cano

Dr. D. Juan Ramón Castillo Ferrando

Tutor Dr. D. Manuel Jesús García Martínez

AGRADECIMIENTOS

Gracias a los pacientes y los voluntarios que participaron en los proyectos, sin ellos, este trabajo hubiera sido imposible. De ellos, son los datos.

A mis compañeras, todas, que sufrieron y entendieron mis necesarias ausencias.

A Ainara Madrazo y “Juanfran”, que con su trabajo en la sombra, ha sido posible recopilar y analizar los datos. Ellos son tan autores de este trabajo como yo.

A Curra, ella dio el toque final.

A mis Directores y tutor que han sabido resolver mis grandes dudas, siempre han estado ahí.

A Alfonso Leal, el embrión de esta tesis. Sin él, nunca hubiera empezado.

En último lugar, un especial recuerdo a D. José Villar, él me enseñó esta técnica. Hoy, debería de estar con nosotros formando parte del tribunal de tesis.

Muchas gracias Pepe, gracias a todos¡¡

DEDICATORIA

“Todo dura siempre un poco más de lo que debería” (J. Cortázar), y esta tesis doctoral, no es una excepción. La obligada dedicatoria a todos los que me regalaron su tiempo.

Al profesor Dr. D. Antonio Hevia Alonso, que fue el motor que me impulsó en este proyecto.

A mi familia, que siempre estuvo ahí.

A Patricia, Marta y Nicolás, que además me dieron, día a día sus sonrisas y alegría.

ÍNDICE

0. Glosario	23
1. Preámbulo.....	25
2. Introducción	
2.1. Enfermedad cardiovascular y factores de riesgos cardiovasculares	33
2.2. Función microvascular y técnicas para su determinación	39
2.2.1. Bases de la función microvascular	39
2.2.2. Relación entre enfermedad cardiovascular y función microvascular	46
2.2.3. Técnicas para medir la función microvascular	50
2.2.4. Flujiometría por láser Doppler	61
2.3. Obesidad, función microvascular y enfermedad cardiovascular.....	69
2.4. Síndrome metabólico, función microvascular y enfermedad cardiovascular	74
2.5. Función microvascular y enfermedad cardiovascular en síndrome de Cushing ...	76
3. Hipótesis.....	83
4. Objetivos	
4.1. Objetivo principal	89
4.2. Objetivos secundarios	89
5. Material y método	
5.1. Sujetos del estudio	93
5.2. Diseño del estudio	96
5.3. Realización de la flujometría por láser Doppler	97
5.4. Reproducibilidad de la técnica	103
5.5. Variables del estudio	
5.5.1. Variables dependientes	103
5.5.2. Variables independientes	104
5.6. Análisis estadístico	
5.6.1. Métodos generales	104
5.6.2. Reproducibilidad de la técnica	105
6. Resultados	
6.1. Reproducibilidad de la flujometría por láser Doppler en pacientes con obesidad mórbida	109
6.2. Impacto de la cirugía bariátrica en la función microvascular de pacientes con obesidad mórbida	114
6.2.1. Características clínicas de la cohorte de pacientes con obesidad mórbida y grupo control sin obesidad	114

6.2.2. Medida de la PORH por láser Doppler en pacientes con obesidad mórbida previa a la cirugía bariátrica	118
6.2.3. Características clínicas de la cohorte de pacientes con obesidad mórbida al año de la cirugía bariátrica	119
6.2.4. Medida de la PORH por láser Doppler en pacientes con obesidad mórbida al año de la cirugía bariátrica	123
6.3 Función microvascular en pacientes obesos con síndrome de Cushing curados	
6.3.1 Características clínicas de la cohorte de pacientes con síndrome de Cushing curados	124
6.3.2 Medida de la PORH por láser Doppler en pacientes con síndrome de Cushing curados	126
6.3.3 Asociación entre comorbilidades y disfunción microvascular en pacientes con síndrome de Cushing curados	128
7. Discusión	
7.1. Reproducibilidad de la técnica	133
7.2. Función microvascular en pacientes con obesidad mórbida	135
7.3. Función microvascular en pacientes con síndrome de Cushing curados	138
8. Conclusiones	143
9. Bibliografía	147
10. Anexos	165
10.1. ANEXO I	165
10.2. ANEXO II	185
10.3. ANEXO III	209

0. GLOSARIO

AUC_H: área de hiperemia

AUC_O: área de oclusión

Ach: acetilcolina

ACTH: hormona adrenocorticotropa

AHJ: American Heart Journal

AP-1: factor de activación proteína-1

ARB: bloqueadores de los receptores de la angiotensina II

BZ: cero biológico

CCAA: Comunidades Autónomas

CCI: coeficiente de correlación intraclase

CLU: cortisol libre urinario

CRH: hormona liberadora de la corticotropina

DPP: Diabetes Prevention Program

ECV: enfermedad cardiovascular

ET: endotelina

FCD: densidad funcional capilar

GEERI: European Group for the Study of Insulin resistance

GH: hormona del crecimiento

GLUT-4: proteína transportadora de glucosa-4

HDL_C: lipoproteína de alta densidad

HTA: hipertensión arterial

IDF: International Diabetes Federation

IECA: inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina

IMC: índice de masa corporal

LDL_C: lipoproteína de baja densidad

LDF: flujometría por láser Doppler

LED: diodos emisores de luz

NADP: coenzima nicotina mida adenina dinucleótido fosfato

NCEP: National Cholesterol Education Program

OMS: Organización Mundial de la Salud

ON: óxido nítrico

OPS: polarización ortogonal espectral

PET: tomografía por emisión de positrones

PF: pico de flujo

PORH: hiperemia reactiva post-isquémica

ROS: especies reactivas del oxígeno

RNS: especies reactivas del nitrógeno

SDF: iluminación lateral de campo oscuro

SPECT: tomografía computerizada de emisión monofotónica

tcoO₂: presión transcutánea de oxígeno

TIMI: infarto miocárdico tromboembólico

UP: unidades de perfusión

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

1. PREÁMBULO

1. Preámbulo

Enfermería como innovación en el desarrollo de las técnicas: un ejemplo en la medida de la función endotelial por láser Doppler

La enfermería como cualquier otra profesión ha ido evolucionando a lo largo de la historia de la mano del concepto que la sociedad ha ido atribuyendo a las personas, y de los supuestos culturales y sociales que conforman e informan el modo de acercarse a ella.

Tradicionalmente se ha identificado a la enfermería con el acto de cuidar a las personas. Estos actos y los actores de los mismos han ido variando, a su vez, a lo largo de la historia pero sin olvidar el eje común de la profesión: cuidar.

En el pasado, la principal función de los enfermeros era prestar cuidados y consuelo. Actualmente, la enfermería contemporánea requiere de la adquisición de conocimientos y habilidades para realizar la promoción de la salud y la prevención de la enfermedad, considerando a la persona un ser biopsicosocial, y adquiriendo nuevas habilidades en el marco asistencial.

Los cuidados de enfermería los identificamos con cuidar a las personas, centrándonos en la actividad específica y propia que da respuesta a las necesidades de los ciudadanos en materia de salud, tanto cuando trabajan de forma individual como cuando lo hacen formando parte de un equipo de salud. Pero esta identificación de las actividades no siempre ha sido así. Como toda ocupación que demanda un reconocimiento como profesión, ha estado sometida a los vaivenes de la historia. Independientemente de estos movimientos, la profesión vive momentos de certeza e incertidumbres. Certeza por los trabajos en curso tanto de aplicación inmediata a la práctica como pueden ser los planes de cuidados o los inicios en el campo de la investigación. Incertidumbres por la falta de indefinición de las tareas que le son de exclusiva competencia, aquellas que crean su propio profesional. Incertidumbre sobre su propia formación profesional, poco adecuada a la realidad práctica e incertidumbre en su puesto de trabajo por los cambios en los sistemas de contratación.

Diferentes organizaciones dirigen sus esfuerzos a conseguir el reconocimiento profesional de los profesionales de enfermería en todos los ámbitos: formación continuada acorde a las necesidades de las nuevas organizaciones sanitarias (mercado), implantación de la carrera profesional (evaluación de competencias profesionales), reflexión sobre las tendencias de futuro y las estrategias de adaptación profesional. Claramente, ante el futuro que se nos presenta, la profesión tiene que estar preparada y actualizada para los nuevos conocimientos. Tiene que asumir nuevos roles y prepararse desde diferentes puntos de vista para afrontar los retos que ante cualquier cambio puede aparecer, y sobre todo, tiene que ir asumiendo nuevas responsabilidades que vayan ampliando el terreno de los cuidados. Siendo una profesión de soporte, la mayoría de la innovación en la enfermería es exógena, es decir, generada por actores externos a la misma.

Existe la percepción de que la enfermería innova poco por sí misma, y es preocupante que, siendo una profesión imprescindible como enlace de transmisión de la salud a la población, no progresa a la misma velocidad que la medicina, o que no avance, como colectivo, igual que otras profesiones.

El soporte a la persona, tanto sana como enferma, mediante la educación sanitaria para el cuidado de otros: cuidar (parte asistencial) y la aplicación del tratamiento (parte técnica) configuran las dos facetas básicas del trabajo de la enfermería. De la parte técnica trata la presente tesis.

La presente tesis utiliza aspectos teóricos próximos a la realidad profesional. Además, se ilustra con vivencias personales para valorar el sentido de las palabras y la intención de las mismas, por cuanto el objetivo del trabajo conlleva una larga valorativa de ambición: conocer primero y pensar posteriormente lo que se conoce, para situarlo exactamente en su contexto y avanzar profesionalmente en la medida que la sociedad avance. La posibilidad existe, puesto que la enfermería es espectadora de primera fila en el panorama sanitario, cultural y social. Pero para ello, la enfermería requiere abrirse a nuevas disciplinas, intercambiar conocimientos y perspectivas, y alejarse de la subsunción a poderes externos que han condicionado y organizado su progreso y evolución hasta nuestros días.

El estudio histórico del trabajo enfermero desvela que la enfermería ha sido construida desde organismos externos (Iglesia, Estado y la influencia de la medicina) quienes han configurado, desde la vocación, la técnica y la cooperación, lo que actualmente es la profesión. Las religiosas sanitarias estaban bajo el control de la Iglesia. La secularización las situó bajo el control estatal mediante su inclusión en la estructura sanitaria. Finalmente, la profesionalización las situó subordinada a la medicina, que ejercía su docencia. Tal vez, estos procesos hayan hecho de la enfermería una profesión silenciosa y obediente, tal vez hasta el punto de que hayan renunciado a pensar por sí misma y en sí misma. El silencio profesional en enfermería, la invisibilidad y su grado de intangibilidad todavía son realidades de graves consecuencias para la innovación.

Nuestra actividad profesional está relacionada con tres aspectos básicos: cuidar, tratar y curar. Cuidar representa la parte asistencial de la enfermería, relacionada con los aspectos emocionales, culturales y sociales de la salud y la enfermedad. Tratar, está asociada a la técnica en enfermería y tiene dos vertientes: la técnica terapéutica (administración del tratamiento prescrito por el médico) y la técnica diagnóstica. Finalmente, curar, se ejerce exclusivamente por la medicina, pero está muy vinculada a la enfermería a través del tratamiento.

En la presente tesis se ha trabajado con dos grandes grupos de pacientes con disfunción endocrina, pacientes con obesidad mórbida y pacientes con síndrome Cushing. Estos dos grupos de pacientes son pacientes a los que el personal de enfermería atiende en gran grado dada el alto número de comorbilidades que suelen presentar. En ambos grupos de pacientes pretendemos determinar si la obesidad (o la disminución de ésta cuando los pacientes son intervenidos de cirugía bariátrica) tiene un impacto directo sobre la función endotelial o microvascular .

En este trabajo, donde se recogen los tres pilares básicos de la profesión enfermera: cuidar, tratar y curar, pretendemos ilustrar como el profesional de enfermería desarrolla un papel fundamental a la hora de recoger y medir la función endotelial mediante una técnica diagnóstica no invasiva como es la flujometría por láser Doppler, mientras que por otro lado, se acercará y tendrá acceso directo a pacientes con patologías tan complejas como la obesidad mórbida y la enfermedad de Cushing.

En los cuidados básicos que ambos grupos de pacientes van a demandar, en las diferentes técnicas que en ellos se van aplicar y en la respuesta a la enfermedad, iremos viendo como resultado de los diferentes tratamientos, el profesional de enfermería va asumiendo un papel fundamental que se verá reflejado en el resultado del trabajo realizado.

2. INTRODUCCIÓN

2 Introducción

2.1 Enfermedad cardiovascular función microvascular, una manera de aproximarse a la técnica de flujometría por láser Doppler

En sentido amplio, la enfermedad cardiovascular (ECV) hace alusión a cualquier proceso de índole cardiovascular, incluyendo las cardiopatías congénitas, valvulopatías, endocarditis y vasculitis. En sentido estricto, deberían incluirse como ECV los procesos de índole ateroscleróticos más prevalentes por su interés epidemiológico y preventivo como son:

- a. Enfermedad coronaria, afectación de arterias coronarias manifestadas por el infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardíaca y muerte súbita de origen coronario.
- b. Enfermedad cerebrovascular, afectación de arterias carótidas, cerebrales y vertebrales asintomáticas (subclínicas) o manifestadas por ictus o ataques isquémicos transitorios.
- c. Enfermedad vascular periférica, afectación de arterias ilíacas y femorales manifestadas por clínica de claudicación intermitente o gangrena.
- d. Aterosclerosis aórtica y aneurismas aórticos (torácicos y abdominales).

En el primer número de la prestigiosa revista *American Heart Journal (AHJ)*, en Octubre de 1925, Lewis A. Conner escribió textualmente: *“the newly awakened interest in disorders of the cardiovascular system has rapidly led to the recognition of heart disease as a significant public health problem that can no longer be disregarded”* (“el renovado interés por los problemas cardiovasculares ha traído como consecuencia el reconocimiento de la enfermedad cardíaca como un problema de salud pública que no debería ser ignorada por más tiempo”). Como si hubiera sido una premonición, en los siguientes cuarenta años hubo un notable incremento, a niveles de epidemia de la ECV, seguido de un decrecimiento de treinta años motivado por una mejora en el diagnóstico y tratamiento de los llamados “factores de riesgos”. En el presente, sin embargo, no tenemos motivos para el optimismo, porque en la última década ha habido un nuevo incremento de la enfermedad cardíaca de origen isquémico o enfermedad coronaria.

Las ECV son la principal causa de mortalidad en los países desarrollados, siendo la cardiopatía isquémica y la enfermedad cerebrovascular las que ocupan el primero y segundo lugar respectivamente. En E.E.U.U., por ejemplo, sigue siendo la primera causa de muerte en varones mayores de 45 años y mujeres mayores de 65 años, y es responsable de una de cada tres muertes. En la Unión Europea, las ECVs son también la causa principal de mortalidad.

Estas enfermedades afectan a las personas de edad avanzada, de forma que nueve de cada diez defunciones se producen después de los 65 años. Las diferencias de mortalidad entre hombres y mujeres son menos pronunciadas que para otras causas de muerte.

Las ECVs constituyen la primera causa de muerte en España. Tal y cómo muestran la figura 1, en el año 2014, el grupo de las enfermedades del sistema circulatorio se mantuvo como la primera causa de muerte (con un tasa de 252,7 fallecidos por cada 100.000 habitantes).

Año 2014	Total	Hombres	Mujeres
Total enfermedades	395.830	201.571	194.259
Enfermedades isquémicas del corazón	32.564	19.101	13.463
Enfermedades cerebrovasculares	27.579	11.573	16.006
Cáncer de bronquios y pulmón	21.251	17.194	4.057
Demencia	17.883	5.838	12.045
Insuficiencia cardiaca	17.095	6.214	10.881
Enf. crónicas de las vías respiratorias inferiores (ECVRI)	15.546	11.434	4.112
Enfermedad de Alzheimer	14.022	4.099	9.923
Cáncer de colon	11.797	6.964	4.833
Enfermedad hipertensiva	11.573	3.699	7.874
Diabetes mellitus	9.625	4.100	5.525
Neumonía	8.445	4.357	4.088
Insuficiencia renal	6.395	2.975	3.420
Cáncer de mama	6.325	94	6.231
Cáncer de páncreas	6.287	3.199	3.088
Cáncer de próstata	5.863	5.863	-

Figura 1. Número de defunciones según las causas de muerte más frecuentes. Año 2014.
Fuente. INE. 2014.

A nivel más detallado, dentro del grupo de enfermedades circulatorias, las enfermedades isquémicas del corazón (infarto, angina de pecho, etc.) y las cerebrovasculares volvieron a ocupar el primer y segundo lugar en número de defunciones. No obstante, en ambos casos, se produjo un descenso de muertes respecto al año anterior (del 2,5% y 1,0%, respectivamente). Por sexo, las enfermedades isquémicas del corazón fueron la primera causa de muerte en los hombres y las enfermedades cerebrovasculares en las mujeres (Instituto Nacional de Estadística. 2014).

Las enfermedades del sistema circulatorio fueron la principal causa de muerte en la mayoría de las Comunidades Autónomas (CCAA) como muestra la figura 2. Las mayores tasas brutas de mortalidad por estas enfermedades se registraron en Principado de Asturias (386,1 fallecidos por 100.000 habitantes), Galicia (349,9) y Castilla y León (332,7) (Instituto Nacional de Estadística. 2014).

	Sistema circulatorio	Tumores	Sistema respiratorio	Sistema nervioso	Sistema digestivo
TOTAL	252,7	237,4	94,4	50,4	41,7
Andalucía	262,1	203,7	81,8	44,7	41,9
Aragón	315,5	285,5	103,8	59,2	49,1
Asturias, Principado de	386,1	336,6	131,1	65,0	55,5
Baleares, Illes	204,2	188,9	69,4	41,9	32,8
Canarias	164,7	199,7	79,7	32,9	27,7
Cantabria	277,9	291,7	125,9	53,9	45,9
Castilla y León	332,7	318,3	127,3	61,0	55,8
Castilla-La Mancha	254,0	235,0	116,6	52,6	46,4
Cataluña	228,8	232,9	84,9	62,0	40,8
Comunitat Valenciana	257,7	231,9	83,4	58,3	39,4
Extremadura	313,4	275,6	112,4	50,6	53,8
Galicia	349,9	300,5	119,5	51,3	51,3
Madrid, Comunidad de	179,5	202,5	98,4	30,6	31,3
Murcia, Región de	208,6	195,4	86,5	47,5	38,1
Navarra, Comunidad Foral de	232,9	258,8	94,0	64,5	44,5
País Vasco	249,2	293,7	86,5	59,6	43,8
Rioja, La	283,1	250,3	88,5	76,4	43,6
Ceuta	200,9	158,4	50,8	27,2	40,2
Melilla	178,4	149,9	55,9	28,5	30,9

Figura 2. Tasas brutas de mortalidad por 100.000 habitantes de las principales causas de muerte según las Comunidades Autónomas
Fuente. INE. 2014.

No se conocen con exactitud las razones del patrón geográfico de la mortalidad cardiovascular en España. Parece que entre los factores determinantes se encuentran el nivel socioeconómico, la actividad física y factores dietéticos, como el consumo de frutas, pescado y vino (Rodríguez Artalejo F. et al.1996), así como factores que actúan desde la temprana infancia (Guallar-Castillón P. et al. 1999).

Pero la importancia de la ECV radica tanto en su presente como en su futuro, ya que está aumentando de forma alarmante en todo el mundo, con un crecimiento global que se estima del 28,9% al 36,3% desde 1990 al año 2020 como consecuencia del envejecimiento poblacional, el sedentarismo, el sobrepeso, la tasa de diabetes mellitus. Este crecimiento es aún más notable en países en desarrollo por tres motivos principales:

- erradicación de gran parte de las enfermedades infecciosas,
- marcado aumento en el consumo de tabaco,
- mayor incremento de las tasas de obesidad y diabetes mellitus tipo II como consecuencia de la llamada colonización cultural y consumo de comida basura, en culturas con un régimen alimentario autóctono tradicionalmente más sano.

Las variaciones globales de la enfermedad cardiovascular, están relacionadas con variaciones temporales y regionales conocidas como factores de riesgos. Los análisis epidemiológicos y de mortalidad demuestran una alta correlación entre mortalidad por ECV y tres factores de riesgos principales: hábito tabáquico, colesterol sérico e hipertensión; y sugiere que las variaciones regionales están basadas en las diferencias entre los factores de riesgos, que a continuación, pasamos a describir.

A. Factores de riesgos conductuales

○ Tabaco

En todo el mundo 1.200 millones de personas fumaban en el año 2.000, número que tiene previsión de aumentar a 1.600 millones en el 2.030. El tabaco causa actualmente 5 millones de muertes anualmente un 9% de todas las muertes. Si el actual patrón tabáquico continúa, para el año 2.030, los datos globales de enfermedades atribuibles al tabaco alcanzarán los diez millones de muerte anuales.

○ Dieta

La ingesta total de calorías aumenta en los países en desarrollo. En relación a las enfermedades cardiovasculares, un elemento clave del cambio dietético es el aumento de la ingesta de grasas animales saturadas y grasas vegetales hidrogenadas, las cuales contienen ácidos grasos trans-aterogénicos y aumento de carbohidratos. A modo de

ejemplo, la grasa aporta menos del 20% de las calorías en la China rural y la India, menos del 30% en Japón y por encima del 30% en E.E.U.U.

- Inactividad física

El aumento de la mecanización que acompaña a la transición económica actual nos ha conducido a un cambio de una demanda física de un trabajo principalmente basado en la agricultura al actual sedentarismo industrial de trabajo de oficina y trabajo en casa. En los EEUU, aproximadamente, el 25% de la población no participa en ninguna actividad física de entretenimiento y solamente el 22% realiza una actividad física durante al menos 30 minutos, mientras que en otros países como China, la actividad física está integrada en la vida diaria. Aproximadamente el 90% de la población urbana anda o monta en bicicleta diariamente al trabajo, a la compra o al colegio.

B. Factores de riesgos metabólicos

- Obesidad

Aunque la obesidad es un factor independiente claramente asociado con el aumento del riesgo de la ECV, mucho de los factores atribuidos a la obesidad pueden ser mediados por otros factores de riesgos asociados a obesidad como hipertensión, diabetes mellitus y hiperlipidemia. La obesidad y sus consecuencias sobre la función microvascular y la ECV se desarrollan de forma más extensa en el siguiente apartado.

- Niveles de lípidos

A nivel global se estima que los niveles elevados de colesterol causan el 56 % de la enfermedad isquémica cardíaca y el 18 % de los ictus, causando unas 4,4 millones de muertes anuales. Los cambios sociales e individuales que acompañan a la urbanización claramente juega un papel primordial, pues los niveles de colesterol plasmáticos tienden a ser mayor en los residentes de las ciudades que entre los residentes de las zonas rurales. Esto es debido al elevado consumo de grasas en la dieta- principalmente de productos animales y aceites vegetales procesados – y el descenso de la actividad física. En países de altos ingresos, los niveles medios de colesterol están en general decayendo, pero en países de ingresos medios, existe una amplia variación de estos niveles.

- Hipertensión

La elevada presión sanguínea es un indicador temprano de transición epidemiológica. En el mundo, aproximadamente el 62% de los ictus y el 49% de casos de enfermedad isquémica cardíaca, están atribuidas a una presión arterial subóptima (> 115 mmHg sistólica), y se cree que afecta a más de 7 millones de muertes al año. El aumento progresivo de la tensión arterial media es aparente en la población industrializada y se está extendiendo de las zonas rurales a las urbanas. Una de las máximas preocupaciones que se presenta en países medio desarrollados, es la elevada tasa de casos sin diagnosticar, y por lo tanto sin tratar. Esto puede explicar, al menos en parte, las tasas tan elevadas de ictus en estos países en relación a la enfermedad cardiovascular en los estadios tempranos de la enfermedad.

- Diabetes mellitus

Como consecuencia del aumento del índice de masa corporal y la disminución de la actividad física, los niveles de diabetes a nivel mundial, predominantemente el tipo II, está en aumento. En el año 2003, 194 millones de adultos, o el 5% de la población mundial, padecían diabetes, con cerca de tres cuartos viviendo en países altamente desarrollados.

Para el 2025, se prevé un aumento del 72% hasta los 333 millones. Para el 2025, el número de individuos con diabetes mellitus tipo II, se espera que se doble en tres de las seis regiones con ingresos bajo-medio como son: África (Norte y Este), Sur de Asia y el África sub-sahariana. Parece que existe también una clara susceptibilidad genética a la diabetes mellitus en varios grupos étnicos y razas. Así por ejemplo, estudios migratorios sugieren que el sur de Asia y la India, tienden a mayores riesgos que la población de Europa.

En España, en el último estudio presentado Di@bet.es (Soriguer F. et al. 2012), usando una muestra representativa de la población total española, demuestran que la prevalencia de diabetes mellitus en España es del 13.8%.

Aunque los ratios de enfermedad cardiovascular están disminuyendo en países de altos ingresos, están aumentando en otras regiones del mundo. Las consecuencias de esta epidemia prevenible, será substancial en varios niveles: mortalidad individual y morbilidad, sufrimiento familiar y estrategias económicas.

Para disminuir el impacto se pueden aplicar tres estrategias complementarias:

- Primera, los factores de riesgos cardiovasculares pueden disminuirse en la población mediante medidas públicas de salud, como campañas nacionales contra el tabaco, dietas no saludables e inactividad física.
- En segundo lugar, es importante identificar los subgrupos con mayor riesgo de la población que intenten beneficiarse de aspectos específicos, intervenciones de bajo presupuesto, incluyendo screenings para el diagnóstico de la hipertensión y el elevado nivel del colesterol.
- En tercer lugar, los recursos deberían estar enfocados en las prevenciones secundarias. En aquellos países con recursos limitados, es mejor un primer paso crítico en el desarrollo de un plan comprensivo que en la valoración de causa, específica de mortalidad y morbilidad, al igual que la prevalencia de los principales factores de riesgos prevenibles.

Mientras tanto, en los países más industrializados debería continuarse con la inversión en investigación y desarrollo de objetivos para prevenir y tratar, siendo consciente de las limitaciones económicas de algunos países.

2.2 Función microvascular y técnicas para su determinación

2.2.1 Bases de la función microvascular

Morfológicamente, la microcirculación implica a los vasos sanguíneos menores de 150 μm de diámetro. Incluye por lo tanto a las arteriolas, capilares y pequeños vasos. La función principal de la microcirculación es optimizar los recursos de los nutrientes y oxígeno a los tejidos en respuesta a la variación de la demanda. Una segunda función importante, es la de evitar amplias fluctuaciones en la presión hidrostática a nivel capilar, causando perturbaciones en el intercambio capilar. Finalmente, es a nivel microcirculatorio cuando se produce una sustancial proporción de la caída de la presión hidrostática. Por todo esto, la microcirculación es extremadamente importante para determinar la resistencia periférica vascular (Erik H. et al. 2007).

Las arteriolas más pequeñas controlan el flujo sanguíneo para cada área de tejido, y las condiciones locales del tejido, controlan el diámetro de las arteriolas. Por lo tanto, cada tejido, en la mayoría de los casos, controla su propio flujo sanguíneo en relación a sus propias necesidades. Las paredes de los capilares son extremadamente delgadas, formadas por una única capa de células endoteliales altamente permeables. Por lo tanto, el agua, los nutrientes y las células excretoras pueden intercambiarse rápidamente y de manera sencilla entre los tejidos y el flujo sanguíneo. La circulación periférica de la totalidad del cuerpo tiene alrededor de 10 billones de capilares con un área de superficie estimada de alrededor de 500-700 metros cuadrados.

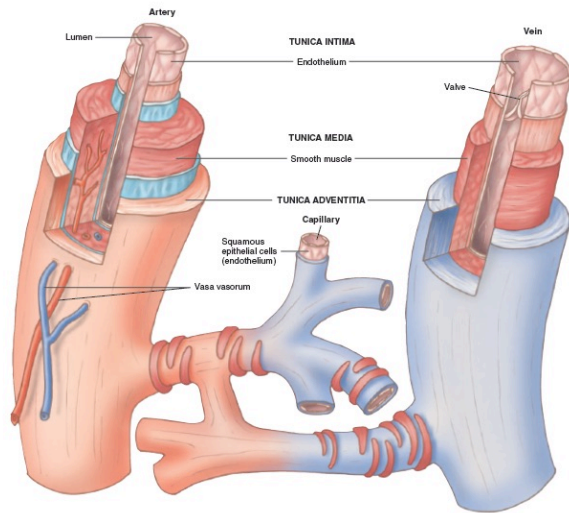
La microcirculación de cada órgano se organiza específicamente para cubrir las necesidades de los órganos. En general, cada arteria nutricia comprende un órgano que se ramifica de seis a ocho veces antes de que las arterias se convierten lo suficientemente pequeñas para ser llamadas arteriolas, las cuales generalmente tienen un diámetro interno de solamente 10-15 micras. Entonces las arteriolas se ramifican a sí mismo de 2 a 5 veces, alcanzando diámetros de 5 a 9 micras en su terminación donde surten de sangre a los capilares. Las arteriolas son más musculares, y sus diámetros pueden cambiar con frecuencia. Las metaarteriolas (terminaciones de las arteriolas) no tienen cobertura muscular continua, pero fibras de la musculatura lisa rodean el vaso en diferentes puntos de los laterales de la metaarteriolas.

Las vénulas son más grandes que las arteriolas y tienen una cubierta muscular más débil. Por lo tanto, la presión en las vénulas es mucho menor que en las arteriolas, por lo que las vénulas pueden contraerse considerablemente a pesar de la debilidad muscular. Esta disposición típica del lecho capilar no se encuentra en todas las partes del cuerpo; sin embargo, algunas estructuras sirven con los mismos propósitos. Lo más importante es que, las meta-arteriolas y los esfínteres capilares están en contacto directo con los tejidos que la nutren. Por lo tanto, las condiciones locales del tejido- las concentraciones de nutrientes, los productos finales del metabolismo, iones hidrógeno- pueden causar efectos directos sobre los vasos controlando el flujo sanguíneo local en cada pequeña área de tejido.

A nivel ultramicroscópico, las paredes están compuestas por una capa unicelular de células endoteliales y rodeadas por una fina membrana fuera del capilar. El grosor total

de la pared capilar es solamente de 0,5 micras. El diámetro interno del capilar es de 4-9 micras, apenas lo suficientemente amplio para que los hematíes y otras células sanguíneas puedan atravesarla.

Tal y como se presenta en la figura 3, el vaso arterial normal presenta tres capas:



- La más interna o íntima, consta de una capa única de células endoteliales.
- La media, formada fundamentalmente por células de músculo liso (elemento contráctil del vaso)
- La adventicia o capa más externa como las arterias nutricias y nervios.

Figura 3. Anatomía de las paredes de las arterias y venas
Fuente. Guyton and Hall. 2016.

Durante mucho tiempo se consideró el endotelio como una simple barrera inerte no trombógena que separaba la sangre del músculo liso vascular. En los últimos 20 años, se ha reconocido que además de las funciones requeridas, el endotelio es el órgano paracrino más activo y grande del cuerpo (Cía Gómez P. et. al. 1999; Maseri A. et al. 2002).

Existe una gran cantidad de moléculas producidas por el endotelio o que actúan a través del mismo en el organismo.

Tabla 1. Principales sustancias producidas por el endotelio.

VASODILATADORES	VASOCONSTRICTORES	ANTICOAGULANTES/ ANTROMBÓTICOS/ ANTIPLAQUETARIOS	PROCOAGULANTES
Producidos por el endotelio			
<ul style="list-style-type: none"> • Adenosina • EDRF • EDHF • PGE₂ • PGF • PGI₂ 	<ul style="list-style-type: none"> • Endotelinas • Peptidoleucotrienos 	<ul style="list-style-type: none"> • Adenosina • EDRF • Glucosaminoglicanos • Activador del plasminógeno • PGE₁ • PGE₂ • PGI₂ • Trombomodulina • Factor tisular 	<ul style="list-style-type: none"> • Colágena • Complejo FVIII-VWF • Fibronectina • Inhibidores del plasminógeno
Actúan a través del endotelio			
<ul style="list-style-type: none"> • Acetilcolina • ADP • Bradicina • Catecolaminas • Histamina • Peptidoleucotrienos • Serotonina 	<ul style="list-style-type: none"> • Angiotensina • Vasopresina 	<ul style="list-style-type: none"> • Heparina 	

Abreviaturas. ADP: Difosfato de adenosina; EDHF: factor hiperpolarizante derivados del endotelio; EDRF: factor relajante derivado del endotelio; FVIII: factor de coagulación VIII; PG: prostaglandinas; VWF: factor de von Willebrand. PGF: Factor de crecimiento plaquetario.

Fuente. Insuficiencia cardiaca crónica. 2015.

El endotelio normal se caracteriza por:

- Mantener el equilibrio entre vasoconstricción y vasodilatación.
- Favorecer la impermeabilidad a las partículas de LDL colesterol.
- Predominio de la acción antitrombótica sobre la protombina.
- Las células musculares lisas ejercen un efecto contráctil.

Las células endoteliales participan activamente y reactivamente en la hemostasia y en las reacciones inmuno inflamatorias. Estas células, regula el tono vascular mediante la producción de óxido nítrico, endotelina y prostaglandinas, implicadas en la aterogénesis, enfermedades autoinmunes y procesos infecciosos. El endotelio produce y reacciona a

varias citoquinas que puede generar dependiendo de las condiciones ambientales, respuestas anti y pro-inflamatorias y generar células inmunoreactivas clave. En la siguiente figura (figura 4), se recogen las numerosas funciones que realizan las células endoteliales.

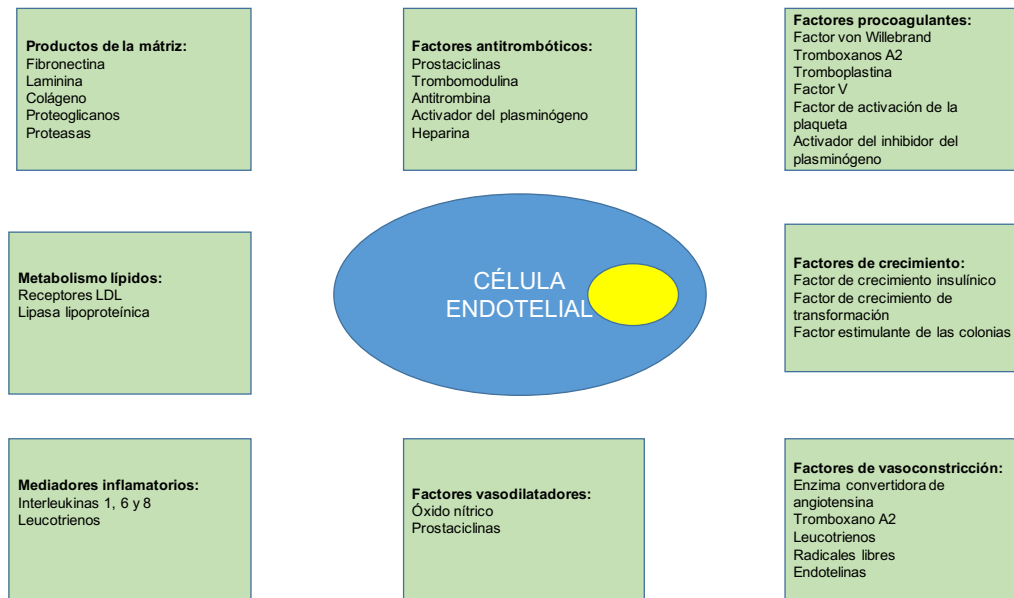


Figura 4. Función de las células endoteliales.
Adaptado de Galley H.F. et al. 2004.

Las células endoteliales ejercen unas acciones significativas autocrinas, paracrinas y endocrinas, influyendo sobre las células del músculo liso, plaquetas y leucocitos periféricos. Las células endoteliales juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la relación no trombogénica entre el tejido y la sangre, regulación de la trombosis, trombolisis, adherencia plaquetaria, tono vascular y flujo sanguíneo. El endotelio es indispensable para la homeostasis corporal; la respuesta de la célula endotelial no controlada está implicada en varios procesos patológicos, incluyendo aterosclerosis, hipertensión arterial, hipertensión pulmonar, sepsis y síndromes inflamatorios.

Las funciones principales de las células endoteliales, las podríamos resumir en:

- Funciones del transporte endotelial.

El endotelio es una barrera importante del libre paso de moléculas y células de la sangre al espacio intercelular y las células. Los mecanismos específicos del transporte, son

esenciales en la circulación de macromoléculas sanguíneas a través de las células endoteliales al espacio subendotelial y cubrir las necesidades metabólicas de las células de los tejidos subyacentes.

- Transporte de glucosa: La regulación de la expresión de la proteína transportadora de glucosa 4 (GLUT-4), es esencial en la modulación del transporte de glucosa y es particularmente en la diabetes e hipoxemia. Es en la barrera hematoencefálica, donde más expresiones del transportador GLUT-4 nos podemos encontrar; sin embargo, estos transportadores se han detectado en células endoteliales de todo el organismo, incluyendo vena umbilical, capilares adrenales, aorta, retina, corazón, placenta y ojos(Mann G.E. et al. 2003).
 - Transporte de aminoácidos: Existen múltiples sistemas de transporte para los amino ácidos en las células endoteliales, pero el sistema catiónico, es quizás el más relevante, por el cual, la L-arginina, el sustrato del óxido nítrico, es transportado. En vista de la importancia que juega el óxido nítrico en la modulación del tono vascular, es sorprendente que haya una información tan limitada sobre los efectos del óxido nítrico sobre el transporte de amino ácidos en las células endoteliales.
- Control tono vascular

El endotelio produce un número importante de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras las cuales regulan el tono vasomotor y regulación de la actividad de las células inflamatorias, y la trombosis (Insuficiencia cardiaca crónica. 2010).

- Óxido nítrico: Las células endoteliales juegan un papel principal en la regulación del tono vascular mediante la producción de numerosos mediadores vasoactivos. Óxido nítrico, prostaciclina, endotelinas y factores hiperpolarizante derivados del endotelio, son poderosas sustancias vasoactivas liberadas del endotelio en respuesta a estímulos humorales como mecánicos, y pueden afectar profundamente tanto a la función como a la estructura vascular subyacente de la musculatura lisa. El óxido nítrico es un poderoso vasodilatador. La producción constante de óxido nítrico por el endotelio, mantiene la vasculatura en estado

de vasodilatación. El óxido nítrico se produce mediante la acción de la sintasa de óxido nítrico en el aminoácido L-arginina, que produce óxido nítrico y L-citrulina, requiriendo O_2 y coenzima nicotinamida adenindinucleótido fosfato reducido (NADP), esencial en el proceso de reducción (Loscalzo J. et al.1995; Jones C.J. et al. 1996).

- Endotelina: Este vasoconstrictor tiene un efecto considerable sobre el tono vascular. Existen tres tipos de endotelinas (ET), pero las células vasculares endoteliales sólo producen la endotelina-1 (ET-1) (Inoue A. et al. 1989). Sin embargo, la distribución de los receptores endotelina, se extiende en todo el cuerpo y, por lo tanto, causando vasoconstricción, la endotelina tiene efectos pleiotrópicos sobre el tejido vascular.
- Leucotrienos: Son moléculas derivadas del ácido araquidónico por la acción oxidativa de la 5-lipooxigenasa. Deben su nombre al hecho de que se aislaron originalmente a partir de los leucocitos y que contienen tres enlaces dobles conjugados en su estructura hidrocarbonada. Los leucotrienos son vasoconstrictores extremadamente potentes de la musculatura lisa. Las células endoteliales no contienen la 5- lipooxigenasa y por lo tanto no pueden generar leucotrienos del ácido araquidónico, pero pueden ayudar con los neutrófilos a metabolizar leucotrienos producidos de los neutrófilos activados.

- **Función inmunitaria**

Las células endoteliales están en una posición estratégica única como papel clave en la respuesta inmunitaria e inflamación. La composición de las respuestas inmunes e inflamatorias depende de la comunicación entre las células por las moléculas solubles, citoquinas; estas incluyen las quimioquinas, factores estimulantes de colonias, interleuquinas, factores de crecimiento e interferones. Todas ellas, proteínas de bajo peso molecular, regulan tanto la amplitud como la duración de las respuestas inmunitarias e inflamatorias.

- Angiogénesis

La angiogénesis es un proceso complejo que implica la activación, proliferación y migración directa de células endoteliales para la formación de nuevos capilares de los vasos sanguíneos existentes. La angiogénesis es mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor que contribuye a la respuesta inflamatoria mediante la estimulación de la liberación de moléculas de adhesión y óxido nítrico, mediante la transcripción del factor de activación proteína (AP-1).

2.2.2 Relación entre enfermedad cardiovascular y función microvascular

En la lucha contra las ECVs, las estrategias preventivas están pasando a ser el principal centro de interés. Los amplios tratamientos farmacológicos e intervencionistas utilizados en los últimos años han tenido éxito en determinados campos, pero los costes asociados a estas estrategias son elevados y los resultados en general no son óptimos (Cannon CP. et al. 2006).

Se han propuesto dos estrategias preventivas diferentes:

- Hacer accesible la prevención farmacológica para el mayor número de personas posible.
- Identificar a los individuos con mayor riesgo de sufrir episodios cardiovasculares y centrar los esfuerzos preventivos en esas personas.

Cada vez existe mayor evidencia de que la microcirculación coronaria, entendida esta, como los vasos coronarios de diámetro inferior a 300 micras, desarrolla un papel crucial en la fisiopatología de numerosas enfermedades cardíacas. Los factores de riesgos cardiovasculares clásicos, como la hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia, obesidad o tabaquismo, cuentan con una reconocida capacidad para inducir el desarrollo de arterioesclerosis en los vasos epicárdicos, pero también afecta profundamente la función y estructura de la microcirculación coronaria. esto, a largo plazo, contribuye al desarrollo, a la perpetuación y a la progresión de numerosas ECVs.

El descubrimiento y la implicación de la disfunción de la microcirculación coronaria y su papel en diversas enfermedades cardiovasculares han permitido entender mejor la fisiopatología de algunas de ellas, y es posible que, en un futuro, permitan llevar a la práctica clínica maniobras de detección precoz de ciertas enfermedades cardiovasculares en las que la microcirculación se afecta precozmente, así como desarrollar terapias dirigidas a eliminar los procesos deletéreos que derivan de su disfunción.

Se han utilizado diversos métodos para intentar medir la presencia de disfunción de la microcirculación, entre ellos: ecocardiografía transtorácica con y sin contraste, o intracoronaria, medición del flujo de infarto miocárdico tromboembólico (TIMI), grado de perfusión miocárdica y grado de hiperemia miocárdica en las coronariografías medidas mediante el flujo de reserva coronario tras la administración de fármacos como dipiridamol o adenosina; biopsia endomiocárdica; y otros, como: tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computerizada de emisión monofotónica (SPECT), resonancia magnética nuclear, doppler intracoronario y microtomografía (Arrebola-Moreno A. et al. 2011).

La disfunción microvascular, dependiendo del marco donde tenga lugar, se puede clasificar en (Camici P.G. et al. 2007):

- Disfunción microvascular coronaria sin enfermedad coronaria obstructiva o enfermedad miocárdica. Clínicamente estos pacientes se presentan como individuos con angina crónica estable, y puede identificarse más objetivamente mediante el cálculo no invasivo de la reserva de flujo coronario.
- Disfunción microvascular coronaria con enfermedad coronaria obstructiva. Puede ocurrir tanto en el seno de una angina estable como de un síndrome coronario agudo con o sin elevación de ST. Esta entidad es más difícil de identificar, y para ello se necesita un abordaje integral, teniendo en cuenta el contexto clínico y el uso combinado de técnicas invasivas y no invasivas.
- Disfunción coronaria microvascular en pacientes con enfermedad miocárdica. Este tipo se sostiene la mayor parte de las veces por un remodelado adverso de las arteriolas coronarias intramurales. Se puede identificar mediante cálculos invasivos y no invasivos de la reserva de flujo coronario y puede llegar a producir isquemia miocárdica. No queda claro si el tratamiento médico puede revertir algunos casos.

Tiene lugar en miocardiopatías primarias (miocardiopatías dilatadas e hipertróficas) y secundarias (hipertensivas y valvular).

- Disfunción microvascular de origen iatrogénico. Por ejemplo, en pacientes después de la administración de alfa-adrenérgicos, o en los que desarrollan angina postervascularización miocárdica. Este último tipo parece ser provocado por vasoconstricción severa o embolización distal de la circulación coronaria.

Actualmente, en general, se prefiere la última opción, dada la limitación de recursos a que han de hacer frente los sistemas sanitarios de todo el mundo y la aparición no infrecuente de efectos secundarios asociados a la administración de productos farmacológicos. Lamentablemente, las enfermedades cardiovasculares implican los trastornos más prevalentes en los países industrializados, y aumentando rápidamente en los países en vía de desarrollo. Los datos de fallecimientos ajustados a la edad para la enfermedad cardíaca coronaria ha disminuido en dos tercios en las cuatro últimas décadas en los Estados Unidos, reflejando la identificación y reducción de los factores de riesgos.

Las ECVs siguen siendo las causas más comunes de fallecimiento, responsables del 35% de todas las muertes, de cada millón de fallecimientos al año, aproximadamente la cuarta parte es debida a causas cardiovasculares. Además, las ECVs tienen una alta prevalencia, diagnosticada en 80 millones de adultos, o aproximadamente el 35% de la población adulta. El aumento de la prevalencia, diabetes mellitus tipo II y el síndrome metabólico, que son factores de riesgos importantes para la aterosclerosis, ahora tratada para revertir el progreso que se ha llevado a cabo en la reducción ajustada por la edad en los valores de mortalidad de la enfermedad cardíaca coronaria.

Durante muchos años la enfermedad cardiovascular ha sido considerada más común en hombres que en mujeres. De hecho, el porcentaje de las muertes secundarias a la enfermedad cardiovascular es mayor entre las mujeres (43%) que entre los hombres (37%). Por lo que aunque el número absoluto de fallecimientos secundarios a la enfermedad cardiovascular ha disminuido a lo largo de las últimas décadas en hombres, este número ha aumentado en mujeres. Factores inflamatorios, obesidad, diabetes mellitus tipo II y síndrome metabólico, parecen jugar unos roles prominentes en el desarrollo de la aterosclerosis

coronario en mujeres que en hombres. La enfermedad arterial coronaria está más asociada frecuentemente con la disfunción de la microcirculación coronaria en mujeres que en hombres.

Los síntomas causados por la enfermedad cardíaca más comunes, provienen de la isquemia miocárdica, la alteración de la contracción y/o relajación del miocardio, obstrucción del flujo sanguíneo o del ritmo anormal cardíaco. La isquemia, que es causada por un desequilibrio entre el suministro de oxígeno cardíaco y la demanda, se manifiesta de la manera más frecuente por un discomfort en el pecho, mientras la reducción de la capacidad de bombeo del corazón comúnmente lleva al cansancio y una presión intravascular elevada por el fallo del ventrículo. Los resultados tardíos en la acumulación anormal de líquido, con edema periférico o congestión pulmonar y disnea.

La obstrucción del flujo sanguíneo, como ocurre en la estenosis valvular, puede causar síntomas parecidos a los del fallo miocárdico. Las arritmias cardíacas a menudo se desarrollan de repente, y los síntomas y signos- palpitaciones, disnea, hipotensión y síncope- generalmente aparecen de manera abrupta y pueden desaparecer tan rápido como se desarrollan.

En estos últimos años, la microcirculación cutánea ha ido ganando interés. Su sencilla y no invasiva accesibilidad, hace que la microcirculación medida en la piel, sea ideal para medirla. Por otra parte, como estructura dinámica, sirve como modelo generalizado de la función microvascular, al existir estudios que han demostrado una correlación de reactividad vascular entre los diferentes lechos vasculares en el cuerpo humano (arterias coronarias, arteria braquial, y microcirculación superficial por nombrar algunos ejemplos) tanto sano como enfermo, al menos en relación a la función endotelial.

Al ser la piel un órgano de fácil acceso, proporciona un lugar adecuado para medir la reactividad microvascular periférica. Por otro lado, los últimos avances tecnológicos han proporcionado unos métodos sencillos y no invasivos para evaluar la función micro vascular en la piel. Por lo tanto, la circulación cutánea se podría utilizar como marcador sustitutivo de la función microvascular sistémica en diversas patologías. Sin embargo, esto nos hace

plantearnos de cómo representar la microcirculación en la piel para extrapolarla a la microcirculación de otros órganos.

2.2.3 Técnicas para medir la función microvascular

A lo largo de estos años, han emergido nuevas técnicas y estrategias avanzadas para explicar la función, comunicación célula-célula y la compleja interacción entre los mediadores farmacológicos en la microvasculatura cutánea (Eriksson S. et al. 2014). Aunque existen diferentes métodos que intentan estimar el flujo sanguíneo de la piel, ninguno es perfecto.

Hasta la fecha, la piel ha sido utilizada como modelo sobre la microcirculación para investigar los mecanismos vasculares sobre diversas enfermedades, como la hipertensión, y otros factores de riesgos cardiovasculares, diabetes o estadios finales de enfermedades renales.

Se conoce como “vasodilatación dependiente del endotelio”, aquella medida por el óxido nítrico generado por la sintetasa endotelial del óxido nítrico. La disminución de su biodisponibilidad constituye el primer fenómeno de disfunción endotelial (Dupuis J. 2005).

La liberación constitutiva de óxido nítrico (ON) por el endotelio tiene como principal función el mantenimiento del tono muscular liso de la pared del vaso, que puede provocarse experimentalmente mediante estímulos físicos o fenómenos químicos. Aunque uno de los fármacos con dicho efecto es la acetilcolina (Ach), dado que requiere administración parenteral intraarterial, su uso en investigación clínica hoy en día, es escaso. Como estímulo físico, se ha utilizado la variación en la tensión de cizallamiento provocada por el incremento transitorio del flujo sanguíneo, generalmente tras un período de isquemia local controlada y que da lugar a la hiperemia reactiva posisquémica (PORH), que es el incremento de flujo sanguíneo por encima de los niveles basales después de una respuesta a una liberación de presión arterial.

Existen una serie de mediadores fisiológicos que contribuyen a la PORH, tales como los nervios sensoriales, mediadores locales de conducción del calcio y potasio activado,

inhibidores del óxido nítrico, etc. que hacen que la PORH por sí misma no se pudiera considerar un test para la función endotelial microvascular en sí misma, pero sin embargo, puede ser usada como herramienta para detectar sobre todo cambios en la función microvascular.

Este fenómeno, descrito por primera vez en 1933 por Schretzenmayr, se ha basado en el desarrollo de técnicas no invasivas para medir la reactividad vascular dependiente del endotelio tras la aplicación de un periodo de isquemia. Celermayer fue pionero en proponer la medición de la dilatación mediada por el flujo para evaluar de forma no invasiva la función endotelial (Celermayer DS. et al. 1992). Otros de los estímulos físicos que se han utilizado ha sido la generación de cambios controlados de temperatura en la superficie cutánea.

Durante más de dos décadas, los métodos para la exploración de la microcirculación cutánea se han basado principalmente en la microscopia óptica y técnicas de láser Doppler, al igual que la medición de la oxigenación tisular.

A. Técnicas derivadas del microscopio óptico

- Videocapilaroscopia

La videocapilaroscopia consiste en la observación directa in vivo de los capilares de la piel utilizando un microscopio con un sistema de epi-iluminación que transmite las imágenes a una cámara de video tal y como se aprecia en la figura 5.

La zona de la piel que más se utiliza para la videocapilaroscopia es la región periungüal. De hecho, los capilares del lecho ungüal son paralelos a la superficie de la piel, lo que facilita su observación. La videocapilaroscopia permite la visualización de los eritrocitos, pero no de las paredes de los vasos. Como consecuencia, sólo son visibles los microcapilares con circulación eritrocitaria en el momento de la realización de la prueba.

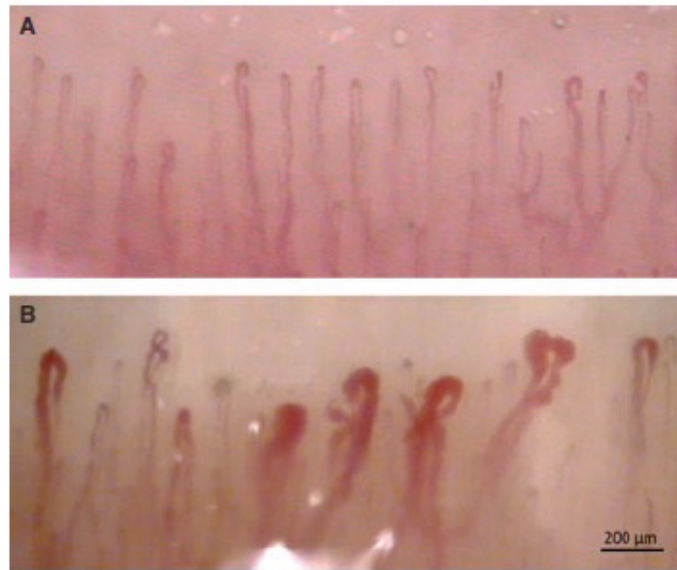


Figura 5. Imágenes representativas de videocapilarescopia (NVC) con una ampliación x 100. (A): patrón normal de una distribución normal homogénea de los anillos capilares. (B): patrón observado en un paciente con esclerosis sistémica, mostrando una desorganización capilar amplia y gigante.
Fuente. Roustit M. et al.2012.

En las enfermedades que afectan a la microvasculatura de la piel (p.ej. esclerosis sistémica) se observan una serie de anomalías morfológicas de los capilares (bucles alargados, capilaridad agigantada, ramificaciones, desorganización capilar) micro-hemorragias y baja densidad capilar (Roustit M et al. 2012). Desde la primera descripción del patrón anormal de capilaridad en los dedos, en enfermedades del tejido conectivo utilizando el capilaroscopio, la técnica ha jugado un papel creciente en el diagnóstico precoz de la esclerodermia, y cuando se usa, mejora significativamente la sensibilidad en el diagnóstico de los pacientes con esclerosis sistémica limitada.

Se ha propuesto, para mejorar el rendimiento capilar, unas pruebas de reactividad que incluyen la PORH venosa y arterial. Éstas, permiten una evaluación de la densidad máxima con buena reproducibilidad. La administración de sustancias colorantes orgánicas (p. ej. fluorescencia) ligado a la capilaroscopia se ha utilizado para evaluar y establecer unos patrones de disfunción intersticial. De hecho, la fluorescencia ligada a la capilaroscopia, mejora el contraste y proporciona un índice de permeabilidad capilar. Esta técnica ha sido

utilizada para estudiar la influencia de la edad sobre la microcirculación (Kelly RI et al. 1995) y en varias enfermedades, incluyendo la diabetes (Bollinger A. et al.1982), la esclerosis sistémica (Hettner M.E. et al. 2008) y psoriasis (Bull RH. et al. 1992).

Esta técnica, sin embargo, está siendo reemplazada por la OPS (polarización ortogonal espectral) y por videomicroscopia de luz polarizada, por las ventajas que ofrece en relación a las imágenes emitidas.

B. Polarización ortogonal espectral (OPS)

- Campo oscuro espectral de polarización ortogonal (OPS-SDF)

La tecnología de imágenes por polarización ortogonal espectral (OPS, en inglés orthogonal polarization spectral) se inventó por Cytometrics Inc. (Philadelphia, PA; EEUU) durante el proceso de elaboración de un videomicroscopio capaz de crear imágenes de alto contraste de la sangre en la microcirculación utilizando la luz reflejada. El objetivo original era elaborar un instrumento para el análisis de imágenes de la microcirculación mediante espectrofotometría con el fin de calcular un recuento sanguíneo completo sin quitar sangre del cuerpo (Cerny V. et al. 2007).

A pesar de su utilidad, existen tres limitaciones importantes de esta técnica (Lindert et al. 2000): la elevada presión de la sonda afecta al flujo sanguíneo, el movimiento lateral del tejido se opone continuamente en la región microvascular seleccionada, y la velocidad del flujo sanguíneo por encima de 1 mm/s son difíciles de medir, por lo que la información sobre el flujo arteriolar sigue sin estar disponible. Estas limitaciones se han podido resolver mediante mejoras técnicas. Se ha desarrollado un dispositivo esterilizante que mantiene una distancia fija entre el sensor y el tejido para eliminar los artefactos de movimientos y presiones lo máximo posible. El análisis de la imagen según el principio de correlación espacial, permite ampliar el rango de la velocidad del flujo sanguíneo hasta 20 mm/s.

La tecnología del campo oscuro espectral de polarización ortogonal OPS-SDF (en inglés, orthogonal polarization spectral stream dark-field), una modalidad de la OPS, se ha incorporado en video microscopios manuales que pueden ser usados para la práctica clínica.

La OPS puede valorar la perfusión tisular, como se aprecia en la figura 6, usando el parámetro de FCD (densidad funcional capilar), que es un parámetro sensitivo que determina el estado de la perfusión en el tejido e indirectamente mide la entrega de oxígeno. El lugar más fácil de acceder en el ser humano, es la boca, donde la OPS reproduce imágenes excelentes de la microcirculación sublingual.

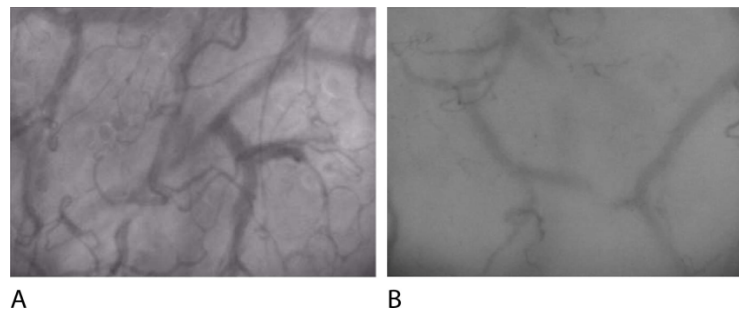


Figura 6. Imágenes del OPS-SDF de los capilares sublinguales de un pacientes con microcirculación normal (A) y anormal (B).
Fuente. Eriksson S. et al. 2014.

A pesar de las limitaciones actuales de la técnica, ésta, representa una herramienta prometedora no invasiva para evaluar la microcirculación tanto en el área experimental como en pacientes críticos.

- Videomicroscopía de luz polarizada

Conocida como iluminación lateral de campo oscuro (en inglés, sidestream dark field (SDF)). Esta técnica óptica fue introducida por Sherman (Sherman H. et al. 1971) y desarrollada para evaluar en forma no invasiva, mediante un videomicroscopio portátil en la cabecera del paciente.

Está basada en el mismo principio de adquisición de imágenes que la OPS, siendo su principal diferencia la fuente de luz iluminada. Múltiples diodos emisores de luz (LED) estrobóscicos ubicados en forma concéntrica, producen el efecto óptimo denominado iluminación lateral del campo oscuro. La luz es absorbida por la hemoglobina contenida en los eritrocitos independiente de su estado de oxigenación y dispersa o reflejada por leucocitos o el resto de las estructuras, por lo que en la imagen obtenida se visualizan por contraste los glóbulos rojos fluyendo en la microcirculación (son vistos como corpúsculo grises o negros) y el resto del tejido de color claro (luz reflejada).

Las imágenes obtenidas por SDF dan una mayor nitidez y contraste comparadas con la OPS, con menor interferencia, originadas por el reflejo de dicho haz de luz sobre la superficie de los órganos. Cabe destacar que la pared vascular no puede ser vista, por ende los vasos solos pueden ser detectados si contienen glóbulos rojos.

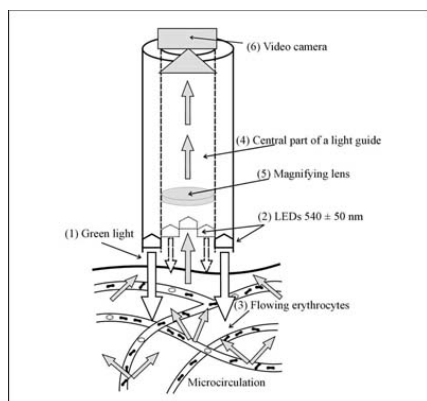


Figura 7. Imagen SDF(iluminación lateral de campo oscuro). Esquema óptico:

1. La luz verde es emitida por (2) un diodo emisor de luz (LEDs) periférico de 540 ± 50 nm hacia el tejido dispuesto en círculo sobre el extremo de la guía de luz. Ésta, penetra directamente la microcirculación que provoca que la hemoglobina de los eritrocitos sean absorbida. Éstos, son considerados (3) células oscuras en movimiento. La luz guiada que proyecta una imagen central (4) está aislada ópticamente de los LED. Una lente de aumento (5) proyecta la imagen sobre una cámara (6).

Fuente. Cerny et al. 2006.

Las ventajas del SDF permiten evaluar múltiples parámetros (densidad, flujo, heterogeneidad) y diferencian según el tamaño de los vasos.

Esta técnica debe ser empleada en tejidos con epitelio delgado y no sensibles al calor o al frío. Habitualmente se usa en lengua, párpados, mucosa rectal o vaginal. Se ha empleado en la evaluación de órganos como el intestino y cerebro durante intervenciones quirúrgicas (Verdat C.L. et al. 2009; Pennings F. A. et al. 2006).

Existen limitaciones técnicas a considerar como son: evitar el movimiento del paciente (necesidad de sedación), requerir que previamente la saliva y las secreciones orales sean eliminadas, emplear un adecuado nivel de presión y aplicar un contraste óptimo de la luz.

C. Técnicas para medir la capacidad vasodilatadora coronaria

Aunque la medición de la función endotelial coronaria continua constituyendo el patrón de referencia, su complejidad y requerimientos técnicos hacen que su uso extensivo no sea posible. La primera evidencia de la existencia de disfunción endotelial en los vasos ateroscleróticos se obtuvo a mediados de los años 80, cuando se utilizó la infusión intracoronaria de acetilcolina para inducir la vasodilatación de las arterias coronarias (Ludmer PL. et al. 1986).

- Coronariografía

La función endotelial coronaria se puede medir mediante el cateterismo cardiaco. Tras la introducción de un catéter arterial, bien por la arteria femoral o radial, se administra un contraste intravenoso. En la mayoría de los protocolos se incluye la infusión intraarterial de acetilcolina y nitroglicerina para evaluar la función endotelial dependiente e independiente del endotelio respectivamente. Las arterias coronarias con endotelio intacto responden a la infusión de la acetilcolina con una dilatación de los vasos epicárdicos y de la microcirculación, resultando en un incremento del flujo sanguíneo coronario. No obstante, si la superficie endotelial está dañado o incluso interrumpido, la acetilcolina, producirá una vasoconstricción paradójica secundaria a la estimulación de los receptores muscarínicos de las células musculares lisa vasculares, con el consiguiente descenso en el flujo coronario (Ludmer PL. et al. 1986).

Dada la naturaleza invasiva y el alto coste de la técnica, hace que no se pueda utilizar de manera extensiva en la práctica clínica ni en estudio de investigación.

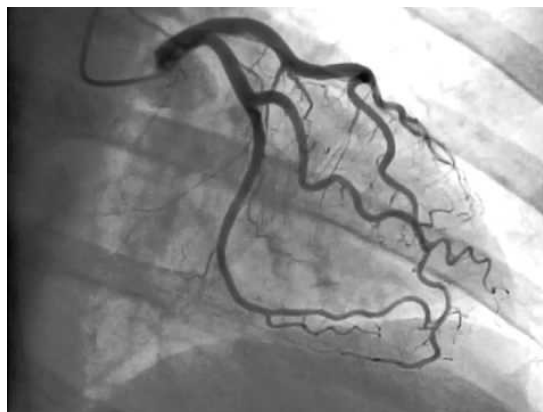


Figura 8. Coronariografía izquierda y derecha.
Fuente. Ramirez-Moreno A. 2003.

- Ecocardiografía de estrés con dipiridamol

La ecocardiografía de estrés, es un método de diagnóstico ampliamente utilizado para evaluar pacientes con enfermedad coronaria conocida o con sospecha de ella. La prueba se empezó a utilizar a partir de 1970. La ecocardiografía de estrés está basada en la comparación de las imágenes en reposo con las de estrés. En la práctica, la medición es cualitativa o semicuantitativa, aunque es posible realizar una evaluación cuantitativa

por medio del módulo de estrés integrado en el ecocardiógrafo que asigna puntuación a los distintos segmentos ventriculares.

El dipiridamol fue introducido por Gould en combinación con imágenes con talio-201 para la detección de enfermedad coronaria. La base para la prueba es que el dipiridamol induce heterogeneidad en el flujo de reservas coronarias entre las arterias coronarias normales y las que presentan estenosis, lo cual es detectado por el talio. Mientras las arterias coronarias normales se dilatan al máximo, aquellas con estenosis coronarias normales se dilatan al máximo, aquellas con estenosis coronarias epicárdicas tienen reserva reducida y, por esta razón, ocurre la mala distribución del flujo.

La administración de vasodilatadores coronarios, como el dipiridamol, puede causar isquemia que se manifiesta como una anormalidad metabólica, anormalidades de motilidad de pared, dolor torácico o infra-desnivel del segmento ST (Stanescu C. 2004; Paul B. 2004).

D. Técnicas para medir la capacidad vasodilatadora periférica

- Dilatación mediada por flujo medida por ecografía de la arteria braquial

Este método mide el diámetro de la arteria braquial, en reposo y tras el incremento en la presión de cizallamiento arterial inducida por la isquemia que provoca el inflado de un manguito de presión, ocasión una hiperemia reactiva y la vasodilatación de la arteria braquial, fundamentalmente debido a la liberación de óxido nítrico del endotelio (Corretti M.C. et al. 2002).

La dilatación mediada por flujo, se expresa en porcentaje de cambio del diámetro de la arteria con respecto al diámetro arterial basal. Celermajer y cols. fueron los primeros en medir esta respuesta in vivo en la arteria braquial o radial (Celermajer D.S. et al. 1992).

Posteriormente Joannide y cols. demostraron que se trataba de un fenómeno dependiente del óxido nítrico, abriendo por tanto una puerta al estudio de la función endotelial (Joannide R. et al. 1995).

Además ha sido validada, al comprobar que los valores de vasodilatación arterial obtenidos mediante este procedimiento, guardan relación con la capacidad vasodilatadora de la circulación coronaria medida a través de la infusión intraarterial de acetilcolina (Anderson T.J. et al. 1995).

En los últimos años se ha comprobado que valores reducidos de la dilatación mediada por flujo, guardan relación con la presencia de factores de riesgos cardiovasculares tradicionales, reflejando el grado de respuesta terapéutica y el riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares futuros (Widlansky M.E. et al. 2003).

Por estos motivos, desde principio de los años 90, la ecografía Doppler se considera la técnica no invasiva de referencia para evaluar la vasoreactividad arterial periférica. Sin embargo, el alto grado de especialización del evaluador y el coste de los equipos, han sido dos limitaciones que han dificultado su implementación en la práctica clínica.

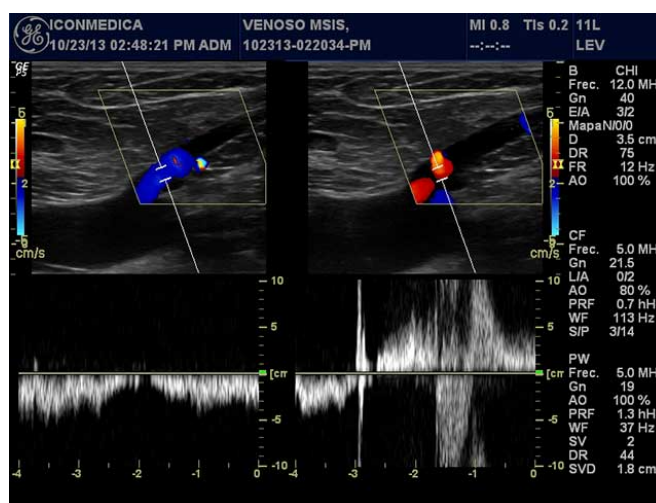


Figura 9. Imágenes de ecografía Doppler arterial y venosa.

Adaptado de ICON MEDICA. Centro Médico.

- Plestimografía de oclusión venosa

La plestimografía mide cambios de volumen en respuesta a variaciones del flujo sanguíneo. La plestimografía de oclusión venosa, es el método más antiguo de investigación del flujo sanguíneo de un tejido, generalmente músculo, a través del cambio en el volumen

tisular derivado del inflado y desinflado de un manguito de presión proximal al mismo tejido. El manguito se infla a una presión que ocluya el retorno venoso pero permite el flujo arterial. La tasa de cambio de volumen será, por tanto, proporcional a la tasa de flujo arterial.

Existe una modificación de esta técnica que permite el estudio de la función endotelial en el brazo. A pesar de que está limitada por su naturaleza semi-invasiva, la plestimografía venosa del brazo ofrece la ventaja de poder administrar de manera intraarterial moléculas, hormonas o fármacos como acetilcolina o nitroglicerina, para cuantificar la vasodilatación dependiente e independiente del endotelio respectivamente (Linder L. et al. 1990). El brazo contralateral generalmente se utiliza como control, para comprobar que la sustancia administrada no ejerce ningún efecto sistémico. También es posible administrar otras sustancias agonistas y antagonistas, e incluso nuevos fármacos en dosis muy pequeñas con escasa repercusión sistémica, en la arteria braquial (Joannide R. et al. 1995).

- **Tonometría arterial periférica**

La tonometría de la arterial radial, aporta una evaluación no invasiva, reproducible y exacta de la forma de onda de presión del pulso central. La tonometría de aplanamiento de la arteria radial se realiza colocando un tonómetro manual (sensor de presión con calibrador de tensión) sobre la arteria radial y aplicando una leve presión para “aplanar” parcialmente la arteria. La presión de la arteria radial se transmite entonces del vaso al sensor (calibrador de tensión) y se registra digitalmente (Arrebola-Moreno A.L. et al. 2012).

A pesar de que la señal de la tonometría arterial periférica es modulada por factores medioambientales, locales y sistémicos también se afecta por la biodisponibilidad del óxido nítrico y, por tanto, depende del estado funcional del endotelio (Nohria A. et al. 2006).

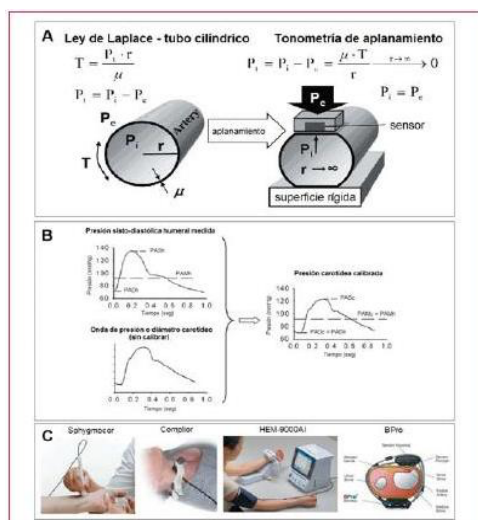


Figura 10. A: Principios que subyacen la medición de la presión intraarterial mediante tonometría de aplastamiento. B: abordaje empleado para calibrar ondas de pulso arterial a partir de conocer la PAS, PAD y la PAM. C: Tonómetros usados para obtener la onda del pulso.

Fuente. Zocalo Y. et al. 2014.

La plestimografía digital detecta cambios pulsátiles en el volumen arterial. Un descenso en el volumen arterial en la yema del dedo, causa un descenso en la columna pulsátil arterial, disminuyendo la señal de medida y viceversa. De forma similar a como se medía la dilatación mediada por flujo, un manguito de presión arterial se coloca en un brazo, mientras que el otro brazo sirve de control interno. Tras medir los cambios del volumen sanguíneo basal, se infla el manguito a una presión por encima de la sistólica y se desinfla tras cinco minutos para inducir una hiperemia reactiva en el brazo. El índice calculado entre el brazo con la hiperemia reactiva y el brazo control representa una medida de la función endotelial.

- **Flujometría por láser Doppler**

Método para medir la perfusión microvascular de manera no invasiva, será explicada en el siguiente punto de manera más detallada.

- **Iontoforesis con acetilcolina**

La iontoforesis se basa en la capacidad de un fármaco ionizado disuelto para migrar a través de la piel cuando se le aplica una corriente de baja intensidad (Kalia Y.N. et al. 2004). La cantidad del fármaco depositado dependerá de la magnitud y la duración de la corriente aplicada y de la permeabilidad de la barrera cutánea. Cuando se combina con la flujometría por láser Doppler, este método permite la detección de alteraciones en el flujo cutáneo en respuesta a la administración controlada de un fármaco vasoactivo aplicado en la superficie de la piel (Tesselaar E. 2011).

La iontoforesis con acetilcolina origina una respuesta vasodilatadora caracterizada por un pico precoz seguido de un periodo de menor intensidad pero de mayor duración. Se utiliza también nitroprusiato sódico para generar una vasodilatación independiente del endotelio (Cracowski J.L. et al. 2006).

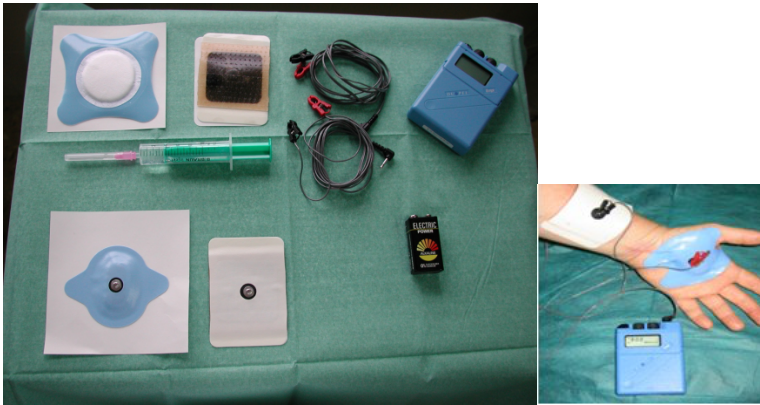


Figura 11. Imágenes del material usado para la realización de la iontoforesis y su aplicación en el paciente.

2.2.4. *Flujometría por láser Doppler*

La flujometría por láser Doppler (LDF), es un método para valorar la perfusión microvascular de la sangre. Se basa en el fenómeno Doppler descrito por el matemático austriaco Johann Christian Doppler (1803-1853). Cuando se dirige un haz de luz láser sobre la superficie cutánea, una fracción penetra a través de ella e interacciona con las células en movimiento, principalmente eritrocitos, que circulan por las arteriolas arteriales, asas capilares y venas post capilares, en un volumen tisular aproximado de 1-1,5 ml.

Como se aprecia en la figura 12, debido al efecto Doppler, los fotones de la luz láser reflejados en esas células sufren un pequeño cambio en su frecuencia que será proporcional a la velocidad de movimiento de las mismas. La luz reflejada, mezcla de frecuencias cambiadas y no cambiadas, se transmite mediante una fibra óptica flexible a fotodiodo del láser Doppler. Posteriormente es amplificada, analizada para determinar la cantidad de cambio en la frecuencia y transformada en una señal analógica. La utilización del láser Doppler permite una medición continua, no invasiva y en tiempo real del flujo sanguíneo en la piel de una determinada región medido por unidades de perfusión (UP).

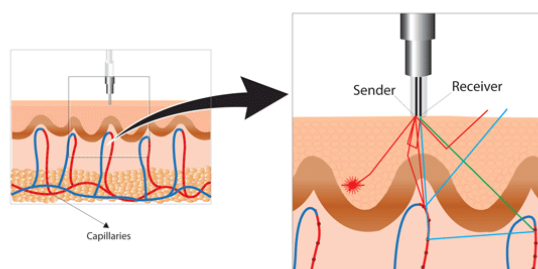


Figura 12. Principio teórico de la flujometría por láser Doppler.
Fuente. Guía usuario. Periflux System 5000. PERIMED

La profundidad de penetración de la luz del láser, depende de la longitud de onda (longitud de ondas cortas penetran superficialmente, mientras que las de longitud más grandes, penetran de manera más profunda) y de la distancia entre las fibras transmitidas y recibidas por lo que permite la inspección de diversas profundidades de la microcirculación cutánea. La profundidad de la medida del láser Doppler varía entre los tejidos de la piel, se estima que es de 0.5-1 mm. Considerando la organización anatómica de los microvasos de la piel, los aparatos de láser Doppler capturan las señales predominantes de las capas subpapilares más profundas –la cara de los plexos arterial y venosa-. Por lo tanto, es obvio que las variables que influirán en la medida de un individuo serán la estructura de la superficie y el grosor de la piel.

A. Aplicación en humanos: calibración, validación y precauciones

Para nuestro trabajo, utilizaremos para la realización de la flujometría, el sistema PeriFlux 5000, figura 13, constituido por una unidad principal que puede ser equipada por una, dos, tres o cuatro Unidades funcionales usadas para diferentes funcionalidades como: presión transcutánea de oxígeno (tcpO_2), temperatura, unidades de presión, etc. En nuestro caso, nuestra Unidad, tiene dos módulos, el monitor láser Doppler PF 5010, y el monitor PF 5020 para medir unidades de calor: que consta de uno o dos sensores, se usa para provocar tests de calor, estabilización de la temperatura o la medida de la misma.



Figura 13: Imágenes del monitor PeriFlux System 5000 utilizado para las flujometrías por láser Doppler.

El Sistema Periflux 5000 ofrece:

- Un sistema multicanal y multifuncional que permita medir diferentes tipos de medidas realizadas en el mismo tiempo, figura 14.
- Fácil manejo usando un simple método de control de los mandos.
- Calibración sencilla con un simple botón.
- Software de PeriSoft para Windows para analizar los datos.
- Se puede conectar una impresora para imprimir la documentación y las gráficas realizadas.

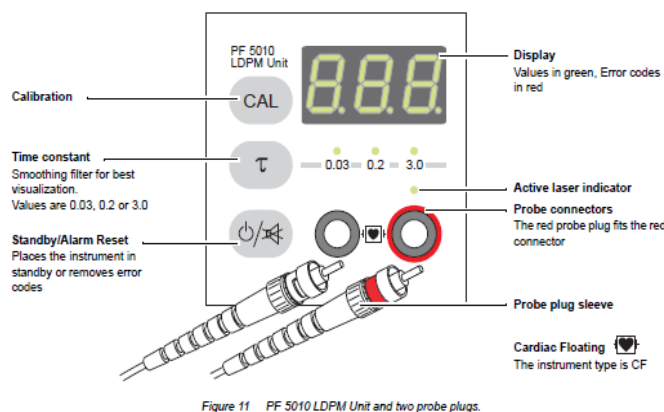


Figura 14: Imagen de los sensores de láser Doppler PF 5010.

Por otro lado, es muy importante, y antes de realizar cualquier medida, el monitor debe ser calibrado al cero instrumental, medida estándar que servirá como referencia para el estudio a posteriori y poder determinar el cero biológico que provocará la isquemia inducida. La calibración se realiza para asegurarnos de que las unidades del PeriFlux en todo el mundo son las mismas. El módulo y los sensores están calibrados a las medidas de 0 UP y 250 UP. Esta calibración debería comprobarse una vez al mes como mínimo o cuando los valores que se estén evaluando estén fuera de los rangos establecidos como “normales”.

Mediante la realización de la flujometría por láser Doppler, se podrá obtener de manera inmediata los valores de perfusión en cualquier momento al colocar el sensor en la superficie de la piel del paciente, y provocar diferentes estímulos, estudiar diferentes respuestas de la función microvascular de los pacientes con los parámetros analizados.

Uno de los aspectos que más nos preocupaba de la realización de la técnica, fue la reproducibilidad de los resultados, que además, era un aspecto muy poco estudiado y con diversos criterios en la comunidad científica. En el trabajo de Matthieu Roustit y Jean-Luc Cracowski (Roustit M. et al. 2012), establece la reproducibilidad de la PORH es variable y el estudio de la misma, bastante conflictivo, dependiendo de muchos aspectos tales como del lugar de la piel, la manera de expresar los datos, y de la temperatura basal de la piel. Por eso, para nosotros, establecer un protocolo desde el principio, en el que la técnica de flujometría por láser Doppler se realizara de la misma manera y bajo las mismas condiciones, y realizar un estudio de la reproducibilidad de la técnica, sobre todo en pacientes con un

perímetro de brazo mayor que en el resto de sujetos, nos pareció de vital importancia y por tanto , el primer paso que se llevó a cabo.

Se valoró la importancia de estudiar la reproducibilidad de la técnica en los propios pacientes con obesidad mórbida antes de someterse a la cirugía bariátrica. Pensamos que el perímetro del brazo de estos pacientes es diferente que a los sujetos sanos, donde la reproducibilidad de la técnica si se ha estudiado y en cambio no hay estudios de reproducibilidad en este tipo de pacientes. Por tanto, el estudio de la reproducibilidad de la técnica en pacientes con obesidad mórbida, nos pareció fundamental por las características anatómicas de los pacientes y su influencia en los resultados.

Para ello, lo primero que se estudió y analizó fue la reproducibilidad de la flujometría por láser Doppler en pacientes con obesidad mórbida, y en segundo lugar, la reproducibilidad de la técnica en los mismos sujetos al año de la cirugía bariátrica.

B. Funciones de la flujometría por láser Doppler

En la figura 15, se muestra una curva generalizada con los diferentes tipos de situaciones, provocadas o no, que podemos encontrarnos al realizar la flujometría por láser Doppler. Entender este diagrama, será fundamental para interpretar las posibilidades que ofrece la técnica.

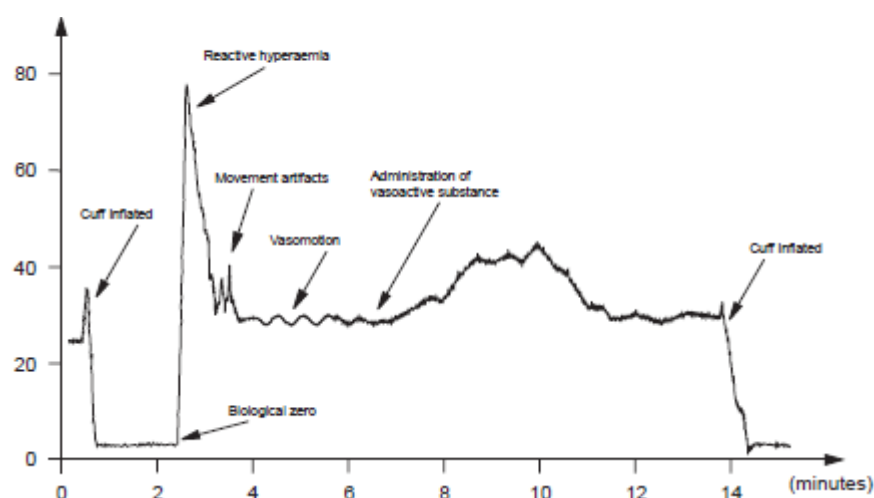


Figura 15. Señales típicas de las medidas del láser Doppler sobre la piel. Se aprecian tanto la isquemia por el esfigmomanómetro, como la vasoactivación provocada por medicación.

En la flujometría por láser Doppler, se provocará una isquemia oclusiva en el antebrazo de los pacientes, que se mantendrá durante un período de 4 minutos, que tras el mismo, se liberará provocando una liberación del flujo sanguíneo y por tanto una respuesta de hiperemia a nivel vascular que analizada por el monitor PERIMED, nos proporcionará unas variables relacionadas con la función microvascular. En la siguiente figura 16, aparece una representación de la flujometría por láser Doppler en un paciente control sano.

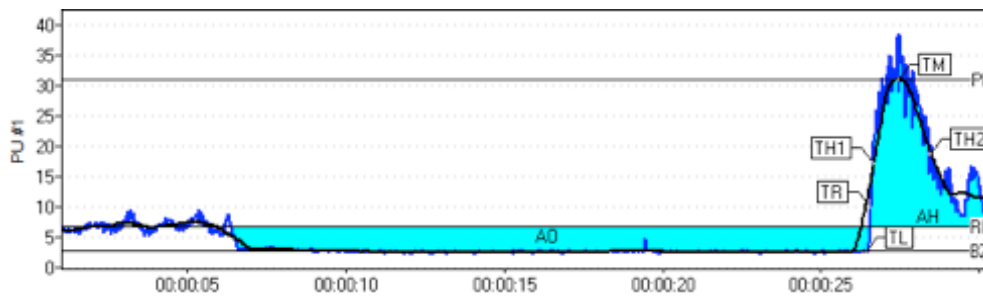


Figura 16. Representación de la gráfica flujometría por láser Doppler

El análisis de la gráfica obtenida, proporciona unas variables fundamentales para el estudio de la respuesta endotelial y su posible relación con la función microvascular. Por un lado, se estudia el área de oclusión (AUC_O), que se mantiene durante los cuatro minutos que se está induciendo la isquemia en el antebrazo del paciente con un esfingomanómetro, y por otro lado, el área de hiperemia (AUC_H), respuesta fisiológica de liberación vascular que alcanza una medida máxima conocido como Peak Flow (PF). Mediante la medida de la flujometría por láser Doppler, se analizarán por tanto una serie de variables, todas ellas muy relacionadas con la función microvascular que serán fundamentales para nuestros estudios.

Principalmente, las medidas que nos proporciona el módulo de PERIMED, que se recogen en la figura 17, serán: área de oclusión, área de hiperemia, Peak Flow o el punto más alto sobre el cero biológico, y la diferencia entre el Peak Flow y el valor medio basal, sabiendo que el valor medio basal es el valor basal antes de la oclusión durante el período de reposo.

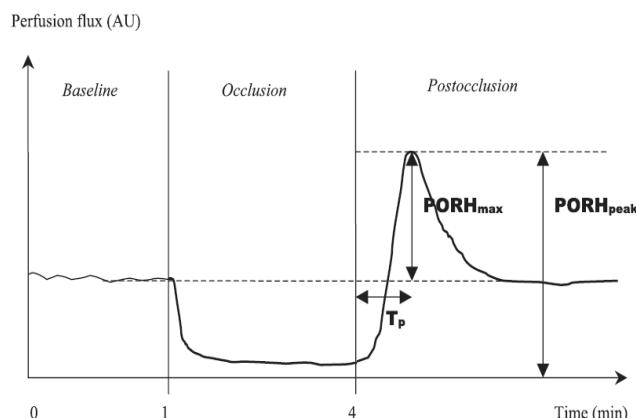


Figura 17. Principales medidas de la flujometría por láser Doppler. Abreviaturas: Perfusion flux (AU)= unidades de flujo; Baseline= período basal; Occlusion= período de oclusión; Postocclusion= período post-oclusión; $PORH_{MAX}$ = diferencia entre el $PORH_{PEAK}$ y el valor medio basal (valor basal antes de la oclusión durante el período de reposo); $PORH_{PEAK}$ = es el área entre el punto más alto alcanzado durante la hiperemia y el cero biológico.

La perfusión sanguínea de un tejido se mide en unidades de perfusión (UP), medida que el aparato utilizará para representar las medidas en función del tiempo. Una de las limitaciones principales de la flujometría por láser Doppler es que no es posible medir valores absolutos de perfusión. De todas maneras, algunas investigaciones han intentado convertir los milivoltios a unidades convencionales de flujo sanguíneo mediante cálculos teóricos, sin que estuviera ampliamente aceptado. Las medidas en la mayoría de los estudios, se expresan como unidades arbitrarias de perfusión (UP) o milivoltios (1 UP= 10 mV).

La flujometría por láser Doppler se ha considerado a menudo, escasamente reproducible, sin embargo, la principal fuente de variación suele estar relacionado con el lugar de medición. Cuando el lugar donde se coloca el sensor esta unificado, la reproducibilidad de la hiperemia postoclusiva, hiperemia termal y la iontoforesis con acetilcolina, los resultados pueden ser comparados bien con el flujo mediado por la dilatación de la arteria braquial, habiendo un coeficiente de variación < 10% (Kubli S. et al. 2000; Boignard A. et al. 2005). Sin embargo, el coeficiente de variación del flujo sanguíneo cutáneo basal es mucho mayor (Bircher A. et al. 1994).

La respuesta vascular a la mayoría de las intervenciones están estandarizadas a nivel de flujo de reposo basal, parecido a la fluctuación mediada por la arteria braquial. Sin

embargo, hay que tener en cuenta que la circulación en la piel es un aspecto vital en la termorregulación normal de los seres humanos, las variaciones en el medio ambiente y/o temperatura local, conlleva a grandes diferencias en el flujo vascular cutáneo, el cual es mayor en las extremidades, donde están presentes las derivaciones venosas (Charkoudian N. et al. 2003). Los problemas relacionados con la medida del flujo basal usando el láser Doppler puede ser parcialmente superado usando una habitación con la temperatura controlada y registrando la temperatura de la piel.

Es importante, por otro lado, tener claro otros conceptos relacionados con la flujometría por láser Doppler.

La profundidad de la medida que se define como la profundidad por debajo de la superficie del tejido a la cual alrededor de dos tercios de la luz penetra y vuelve a la superficie del tejido. La profundidad de la medida depende de las propiedades del tejido como la estructura y densidad de los lechos capilares, la longitud de onda de la luz y la distancia entre las fibras del sensor del láser Doppler. El volumen medido es ese volumen de tejido del cual una contribución a la señal está disponible. Desde que el grado de absorción de la luz por la piel está influenciada por el contenido de la sangre, grado de oxigenación y pigmentación, el valor para la medida de profundidad es estimada. Así por ejemplo, en una piel normal y usando el instrumento de Perimed láser Doppler y una sonda con una separación de fibra estándar (0.25 mm) y una longitud de onda de 780 nm, el volumen medido es de 1,5-1 mm. En órganos con mucho riego sanguíneo como los riñones y el hígado, la profundidad de la medida es considerablemente menor de 1 mm.

Para poder analizar los resultados, es esencial que las medidas estén estandarizadas. La estandarización está relacionada tanto con el aparato como con el paciente. Cuando se quiera comparar las medidas, es necesario considerar los siguientes parámetros:

- tipo de instrumento,
- longitud de onda de la luz del láser,
- tipo de sonda,
- separación de fibra de la sonda,
- tiempo,
- variación de la temperatura.

Los parámetros que incluye a los sujetos, y por tanto pueden ser variables en función de las características de los mismos:

- temperatura corporal del sujeto,
- pCO₂, pO₂ y pH sanguíneo,
- presión arterial,
- posición del paciente,
- cero biológico.

Por otro lado, hay que tener en cuenta los movimientos artefactados. La mayoría de las fibras ópticas pueden generar señales artefactadas si éstas se mueven o golpean durante el registro de las medidas. Además, los artefactos pueden ser generados por los movimientos de la sonda del láser Doppler sobre la piel. Sin embargo, los artefactos pueden reducirse a un nivel mínimo eligiendo la sonda correcta según la aplicación, limpiando la zona de manera correcta con los productos apropiados y fijándola correctamente a la piel del sujeto.

2.3 Obesidad, función microvascular y enfermedad cardiovascular

La obesidad es una enfermedad metabólica crónica de origen multifactorial que puede causar tanto una afectación física como psíquica a la persona de forma directa pero también inducir otras patologías que limitan la esperanza de vida y deterioran la calidad de la misma.

La obesidad mórbida es el estadio más grave de la enfermedad (índice de masa corporal- IMC > 40 Kg/m²) y en España su prevalencia es del 1-2% (Gutierrez-Fisac J.L. et al. 2012), lo que implica que en torno a 500.000 personas están viviendo con un mayor riesgo de fallecer por complicaciones relacionadas con su estado obeso, o bien viviendo una realidad en la que la discapacidad (Ells L.J. et al. 2006; Gregg E.W. et al. 2007) y el estigma psicosocial (Hayden M.J. et al. 2010; Chen E.Y. et al. 2007), les impide disfrutar de una vida satisfactoria. Numerosos estudios han demostrado la importancia de los cambios en el estilo de vida para el tratamiento de la obesidad (Márquez-Ibañez B. et al. 2008). Programas como

el Diabetes Prevention Program (DPP) (Knowler W.C. et al. 2002) y el ensayo clínico Action for Health in diabetes (LOOK AHEAD) (Ryan D.H. et al. 2003), han generado una fuerte evidencia acerca de los resultados a largo plazo de intervenciones multidisciplinarias intensivas sobre los estilos de vida. La modificación del estilo de vida, incluye tres componentes clásicos (Johnston C.A. et al. 2007): actividad física, aspectos nutricionales y terapia de comportamiento, pero el éxito de las terapias de pérdida de peso depende de la estructura, marco teórico y técnicas aplicadas en y por los pacientes.

Las personas con obesidad mórbida, tienen un riesgo significativo de desarrollar complicaciones médicas tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), dislipemias, hipertensión, apnea del sueño, depresión y ciertos tipos de cáncer (Flegal K.M. et al. 2012; Wyatt S. et al. 2006; Martins C. et al. 2011; Schauer P.R. 2012; Sánchez-de-la-Torre M. et al. 2012).

En España, el conjunto de los datos epidemiológicos, apunta a que la prevalencia de obesidad y de sobrepeso, al igual que en todos los países desarrollados, está aumentando de forma preocupante como se puede apreciar en la tabla 2; en el estudio DORICA, se ha estimado que la prevalencia de obesidad en la población adulta de 25 a 64 años es del 15,5%, con una prevalencia más elevada en mujeres (17,5%) que en hombres (13,2%), registrándose una mayor proporción en las regiones del noroeste, Murcia, Andalucía y Canarias. El 0,79% de los hombres y el 3,1% de las mujeres de entre 25-60 años presentan una obesidad grado II, y el 0,3% de los varones y el 0,9% de las mujeres una obesidad mórbida.

Tabla 2. Prevalencia de obesidad en población española por grupos de edad.

Población infantil-juvenil ¹		
Grupos de edad (años)	Hombres (%)	Mujeres (%)
2-9	16,3	11,6
10-17	18,5	9,1
18-24	12,6	14,9
Población adulta ²		
Grupos de edad (años)	Hombres (%)	Mujeres (%)
25-34	7,1	4,8
35-44	11,7	12,2
45-54	16,9	26,4
55-64	21,5	34,2
Población mayor de 65 años ³		
	Hombres (%)	Mujeres (%)
Ancianos no institucionalizados	31,5	40,8
Ancianos institucionalizados	20,5	21,7

Fuente. Sociedad Española Endocrinología, Diabetes y Obesidad; 2009.

En niños y adolescentes, la prevalencia de sobrepeso y de obesidad en los países desarrollados ha aumentado también de forma dramática. En España, las tendencias indican también un incremento de la prevalencia de sobrepeso y de obesidad infantil y juvenil en las últimas décadas, más marcado en varones y en edades prepuberales, pues de acuerdo con los resultados del estudio enKid (Majem et al. 2003), la prevalencia de sobrepeso y obesidad se estima en un 13,9% y el sobrepeso en un 12,4%, siendo la obesidad más prevalente en varones (15,6%) que en mujeres (12%) (Gutiérrez-Fisac J.L. et al. 2004; Aranceta-Bartrina J. et al. 2005). Este fenómeno amenaza con revertir las tendencias favorables en morbilidad y mortalidad cardiovascular observadas en las últimas décadas y, tal como reconoce la American Heart Association, constituye actualmente uno de los más importantes problemas de salud pública (Sociedad Española Endocrinología, Diabetes y Obesidad; 2009).

La obesidad es considerada una enfermedad crónica multifactorial caracterizada por un exceso de tejido adiposo que origina un incremento del peso corporal con efectos deletéreos para la salud. En sentido más estricto, la obesidad no sería una enfermedad sino un síndrome clínico, es decir, un conjunto de síntomas y signos que se manifiesta conjuntamente y con una etiología variada, por lo que la obesidad se puede presentar clínicamente de forma muy diversa; por este motivo, deberíamos hablar de obesidades en lugar de obesidad (tabla 3) (Salas-Salvado J. et al. 2007). Se pueden distinguir diversos tipos de obesidades según los criterios que se utilicen para clasificarla; pueden estar

relacionadas con la cantidad de grasa acumulada, su localización preferente, las causas de la misma, las características clínicas o las etapas de la vida en que se produce.

Tabla 3. Tipos de obesidad según criterios de clasificación.

CRITERIOS	TIPOS DE OBESIDAD
Índice de Masa Corporal	<ul style="list-style-type: none"> • Tipo I • Tipo II • Tipo III (mórbida) • Tipo IV (extrema)
Distribución corporal de la grasa	<ul style="list-style-type: none"> • Superior o androide • Inferior o ginoide
Etiología	<ul style="list-style-type: none"> • Primaria o esencial • Secundaria a: <ul style="list-style-type: none"> ○ Alteraciones hormonales ○ Genopatías ○ Medicamentos ○ Cambios de hábitos
Morbilidad asociada	<ul style="list-style-type: none"> • Simple • Complicada

Fuente. Sociedad Española Endocrinología, Diabetes y Obesidad; 2009.

El uso de indicadores como el Índice de Masa Corporal (IMC) y la medición de la circunferencia de cintura representan estrategias de detección clínica, que nos permiten una adecuada clasificación de la severidad de la enfermedad y del riesgo asociada a ésta, para establecer así medidas de prevención o de manejo tanto de la obesidad como de sus enfermedades asociadas, especialmente en las poblaciones genéticamente susceptibles.

La clasificación de la obesidad, va a variar en función de una serie de aspectos y variables, aunque la más utilizada por todos los sectores científicos y de mayor reconocimiento académico, utilizan el IMC como medida para su clasificación. Es más, incluso diferentes Sociedades y Asociaciones científicas, utilizando diferentes IMC, clasifican la obesidad de diferente como se muestra en la tabla 4 y tabla 5.

Tabla 4. Criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la definición de la obesidad en grados según el IMC.

OMS	Valores de IMC (Kg/m ²)
Normopeso	18,5-24,9
Sobrepeso	25-29,9
Obesidad grado 1	30 – 34,9
Obesidad grado 2	35 – 39,9
Obesidad grado 3	≥ 40

Fuente. Sociedad Española Endocrinología, Diabetes y Obesidad; 2009.

Tabla 5. Criterios de la Sociedad Española para el estudio de la Obesidad (SEEDO) para la definición de la obesidad en grados según el IMC.

SEEDO	Valores de IMC (Kg/m ²)
Peso insuficiente	< 18,5
Normopeso	18,5 – 24,9
Sobrepeso grado 1	25 – 26,9
Sobrepeso grado 2 (preobesidad)	27 – 29,9
Obesidad grado 1	30 – 34,9
Obesidad grado 2	35 – 39,9
Obesidad grado 3 (mórbida)	40 – 49,9
Obesidad grado 4 (extrema)	≥ 50

Fuente.Sociedad Española Endocrinología, Diabetes y Obesidad; 2009.

La cirugía bariátrica es reconocida como la opción de tratamiento para pacientes con obesidad severa o mórbida. Para algunos pacientes, es una herramienta efectiva junto a cambios en la dieta, comportamiento y estilos de vida, para la pérdida de peso y mejoras en las comorbilidades clínicas (O'Kane M. et al. 2016).

Es ampliamente reconocida, que la cirugía bariátrica puede ayudar a varias condiciones médicas asociadas a la obesidad. Los efectos beneficiosos de la cirugía bariátrica sobre la mortalidad y morbilidad están muy descritas en la enfermedad cardiovascular, cáncer y enfermedades respiratorias (Sjostrom L. et al. 2004a; Sjostrom L. et al. 2009b; Sjostrom L. et al. 2012c). Hoy en día, además, está suficientemente claro que la cirugía bariátrica puede ser uno de los tratamientos más efectivos para la diabetes mellitus tipo 2 asociada a la obesidad que cualquier tratamiento médico (Schauer P.R. et al. 2012; Mingrone G. et al. 2012).

El tratamiento quirúrgico de la obesidad en nuestro Sistema Nacional de Salud ofrece la cirugía bariátrica a aproximadamente 6.000 pacientes al año (Lecube A. et al. 2011) de los 500.000/1.000.000 individuos potencialmente candidatos.

2.4 Síndrome metabólico, función microvascular y enfermedad cardiovascular

El concepto de síndrome metabólico, ha sido empleado en las últimas décadas para alertar sobre un perfil de pacientes con alto riesgo cardiovascular, en los que las diferentes enfermedades que asocian, podrían tener una patogénesis común. La obesidad central y la resistencia a la insulina, se han considerado en los últimos años, como dos factores capitales para que los pacientes presenten síndrome metabólico.

Desde que la OMS realizara la primera definición del síndrome metabólico, ha habido muchos científicos que han ido aportando aspectos al desarrollo del concepto. Así, en 1923 Kylin ya describió varios pacientes que presentaban simultáneamente varias patologías hipertensión, hiperglucemia e hiperuricemia. En 1988, Reaven introduce el concepto de Síndrome X, que engloba alteraciones de la glucosa, hiperlipemia e hipertensión y sugiere que la resistencia a la insulina es una característica inicial en estos pacientes. A raíz de aquí, varias organizaciones y sociedades, han ido desarrollando el concepto con sus propios criterios diagnósticos (Tinahones Madueño F.J. 2016).

La primera definición oficial del síndrome metabólico la realiza la Organización Mundial de la Salud en 1999. El síndrome metabólico se definió como: diabetes, glucosa basal alterada, intolerancia a los hidratos de carbono o resistencia a la insulina (superior el cuartil más alto de resistencia a la insulina de la población definida por clamp euglucémico hiperinsulinémico) y, al menos, dos de los siguientes criterios:

- IMC > 30 Kg/m² y/o cociente cintura/cadera > 0,9 en hombres y ≥ 0,85 en mujeres.
- Triglicéridos ≥ 150 mg/dL o HDL-C ≤ 35 mg/dL en hombres o ≤ 39 mg/dL en mujeres.
- Tasa de excreción de albúmina ≥ 20 µg/min.
- Presión arterial ≥ 140/90 mmHg.

Por la complejidad de la definición, el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (en inglés, European Group for the Study of Insulin Resistance-EGIR) (GEERI), desarrolló una versión modificada de esta definición para que se pudiera utilizar con mayor facilidad. Esta nueva versión se basaba en las concentraciones de insulina en ayunas en lugar de la técnica del clamp euglucémico hiperinsulinémico para determinar la resistencia a la insulina.

Según el GEERI: Hiperinsulinismo definido como insulina en ayunas en el cuartil más alto de una población de referencia y, al menos, dos de los siguientes criterios:

- IMC $> 30 \text{ Kg/m}^2$ y/o cociente cintura/cadera $> 0,9$ en hombres y $\geq 0,85$ en mujeres.
- Triglicéridos $\geq 150 \text{ mg/dL}$ o HDL-C $\leq 35 \text{ mg/dL}$ en hombres o $\leq 39 \text{ mg/dL}$ en mujeres.
- Glucosa $> 110 \text{ mg/dL}$.
- Presión arterial $\geq 140/90 \text{ mmHg}$.

Dos años después, el National Cholesterol Education Program (NCEP) introdujo la definición de Adult Treatment Panel III (ATP-III). Propuesta para la práctica clínica, esta definición no incluía una cuantificación específica de la sensibilidad a la insulina y adoptó un abordaje menos “glucocéntrico”, considerando, por igual, todos los componentes del síndrome metabólico.

Para la definición, se consideraba:

- Circunferencia de la cintura $> 102 \text{ cm}$ en hombres y $> 88 \text{ cm}$ en mujeres.
- Concentraciones de triglicéridos $\geq 150 \text{ mg/dL}$.
- HDL-C $< 40 \text{ mg/dL}$ en hombres y $< 50 \text{ mg/dL}$ en mujeres.
- Presión arterial $\geq 130/85 \text{ mmHg}$.
- Glucosa $\geq 110 \text{ mg/dL}$

Debido a las limitaciones que esta definición presentaba, la International Diabetes Federation (IDF) ha tenido en cuenta todos los datos publicados que indican que la adiposidad central (abdominal) es común a todos los componentes de síndrome metabólico. Según este grupo, se define como: obesidad central, valorando la circunferencia de cintura según la etnia (europeos: hombres $\geq 94 \text{ cm}$ y mujeres $\geq 80 \text{ cm}$), si el IMC es $> 30 \text{ Kg/m}^2$, se

da por hecho que existe obesidad central y no es necesario medir la circunferencia de la cintura, más al menos, dos de los criterios metabólicos descritos a continuación:

- Concentración elevada de triglicéridos (≥ 150 mg/dL) o seguir un tratamiento específico para este trastorno lipídico.
- Concentración baja de HDL-colesterol (< 40 mg/dL en hombres o 50 mg/dL en mujeres, o seguir un tratamiento específico para este trastorno lipídico.
- Hipertensión sistólica ≥ 130 mmHg diastólica ≥ 85 mmHg o seguir un tratamiento para hipertensión previamente diagnosticado.
- Hiperglucemia: glucosa plasmática en ayunas ≥ 100 mg/dL o diabetes mellitus tipo 2 ya diagnosticada.

Con todo ello, podemos aportar que ahora se conoce la prevalencia del síndrome metabólico en innumerables poblaciones y la cifra varía en función de las diversas definiciones establecidas para el mismo. Se ha demostrado también que los individuos con síndrome metabólico presentan mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2, siendo esta última comorbilidad, la de mayor riesgo de asociación al síndrome metabólico. También se ha demostrado que cuanto más componentes individuales del síndrome metabólico presenta un individuo, mayor es la probabilidad de desarrollar un efecto adverso. Sin embargo, hay que señalar que el propio concepto de síndrome metabólico tiene sus detractores, ya que no ha proporcionado una nueva visión fisiopatológica ni tampoco ha demostrado utilidad clínica como categoría diagnóstica frente a sus componentes aislados (Tinahones Madueño F.J. 2016).

2.5 Función microvascular y enfermedad cardiovascular en síndrome de Cushing

El síndrome de Cushing se define como el conjunto de signos y síntomas derivados de la exposición prolongada a niveles inapropiadamente elevados de glucocorticoides. Harvey Cushing fue el primero en postular en 1932 que el síndrome de obesidad, plétora, diabetes, hirsutismo y amenorrea, descrito a finales del siglo XIX, podía estar causado por adenomas basófilos de la hipófisis detectados en autopsias en algunos casos.

Poco después, Walter describió los tumores adrenales como causa del síndrome. En las décadas siguientes, se incrementaron los conocimientos sobre su patogenia con la descripción de la producción ectópica de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) y de otros factores, diferentes al ACTH, con capacidad para estimular la función suprarrenal.

El síndrome de Cushing, puede ser ACTH-dependiente y ACTH-independiente. Las formas ACTH-dependientes se caracterizan por una producción excesiva de ACTH por un adenoma corticotropo (síndrome de Cushing hipofisario o enfermedad de Cushing) o por un tumor extrahipofisario (ACTH ectópico) o por las corticotropas normales bajo la influencia de una producción excesiva de CRH (CRH ectópico), y las formas independientes de ACTH, que corresponden al 15% a 20% de los casos y que se deben usualmente a adenomas adrenales, y en menor proporción, al carcinoma adrenal, a la hiperplasia adrenal macronodular o micronodular pigmentada primaria. Estas entidades se manifiestan con una hiperfunción adrenocortical, sin un estímulo de origen central. Los valores de ACTH y la CRH están disminuidos (Gutiérrez R. et al. 2009).

El síndrome de Cushing endógeno es una enfermedad rara (Steffensen C. et al. 2010; Valassi E. et al. 2011), aunque quizás no lo sea tanto si se confirman los resultados de algunos estudios recientes en los que se ha detectado hipercortisolismo, en general discreto y causado por adenomas suprarrenales, en el 2-5% de diabéticos tipo II con sobrepeso y mal control metabólico (León A. et al. 2016).

La distribución por sexo y edad varía en función de la causa del síndrome, donde la enfermedad de Cushing y los adenomas suprarrenales son mucho más frecuentes en mujeres y suelen diagnosticarse entre los 25 y los 50 años de edad. El exceso crónico de cortisol tiene consecuencias sistémicas y da lugar a una compleja serie de síntomas y signos tal y como se aprecia en la tabla 6.

Tabla 6. Signos y síntomas característicos del síndrome de Cushing

Más sugestivos del síndrome de Cushing (mayor especificidad)	
Plétora facial	90%
Atrofia cutánea en jóvenes	85%
Hematomas faciales	65%
Debilidad muscular proximal	60%
Estrías rojizas	60%
Disminución de la velocidad de crecimiento en niños	100%
Menos sugestivos de síndrome de Cushing (menor especificidad)	
Obesidad o ganancia de peso	95%
Disminución de la libido	90%
Alteraciones menstruales	80%
Hipertensión	75%
Hirsutismo	75%
Depresión/ Labilidad emocional	70%
Intolerancia a la glucosa	60%
Fractura u osteopenia	50%
Nefrolitiasis	50%

Fuente. Sociedad Española Endocrinología, Diabetes y Obesidad. 2009.

El incremento de los depósitos grasos es uno de los signos más precoces y origina aumento de peso en muchos casos. Su distribución es anormal, con incremento en los compartimentos viscerales (“obesidad troncal”) y subcutáneos en cara (“cara de luna llena”) y cuello (“giba de búfalo”). La distribución centrípeta de la grasa explica el ensanchamiento mediastínico visible en la radiología simple y los déficits neurológicos que se han descrito en casos raros como consecuencia de los depósitos grasos en el espacio epidural. La disminución del tejido subcutáneo da lugar a una serie de anormalidades en la piel (equinosis ante traumatismos, plétora facial, atrofia cutánea) que son raras en la población general y tienen gran valor diagnóstico.

Los pacientes con síndrome de Cushing muestran una mayor morbilidad y mortalidad debido a varios factores como la hipertensión, coagulopatías y alteraciones del corazón y la vasculatura.

El síndrome metabólico es algo común en el síndrome de Cushing. Como se aprecia en la figura 18, los glucocorticoides provocan una hiperglucemia aumentando la gluconeogénesis hepática e interrumpiendo la liberación de insulina en el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, con la consecuente disminución del uso periférico y disposición de la glucosa. La acumulación de grasa central está asociada con la desregularización de la segregación de adipoquinas facilitados por el aumento del apetito inducido por los glucocorticoides, mejorado por la adipogénesis y el almacenamiento alterado de lípidos. La hiperlipemia, un factor de riesgo cardiovascular, está estrictamente asociada con el aumento de la movilización de los ácidos libres grasos del tejido adiposo, y el aumento de la lipogénesis hepática. El paciente con síndrome de Cushing con obesidad, diabetes mellitus, dislipemia, hipertensión, fenotipos procoagulantes y alteraciones severas de la estructura y funcionalidad cardíaca y sus vasos, es el prototipo de paciente con aumento del riesgo cardiovascular (Ferrau F. et al. 2015).

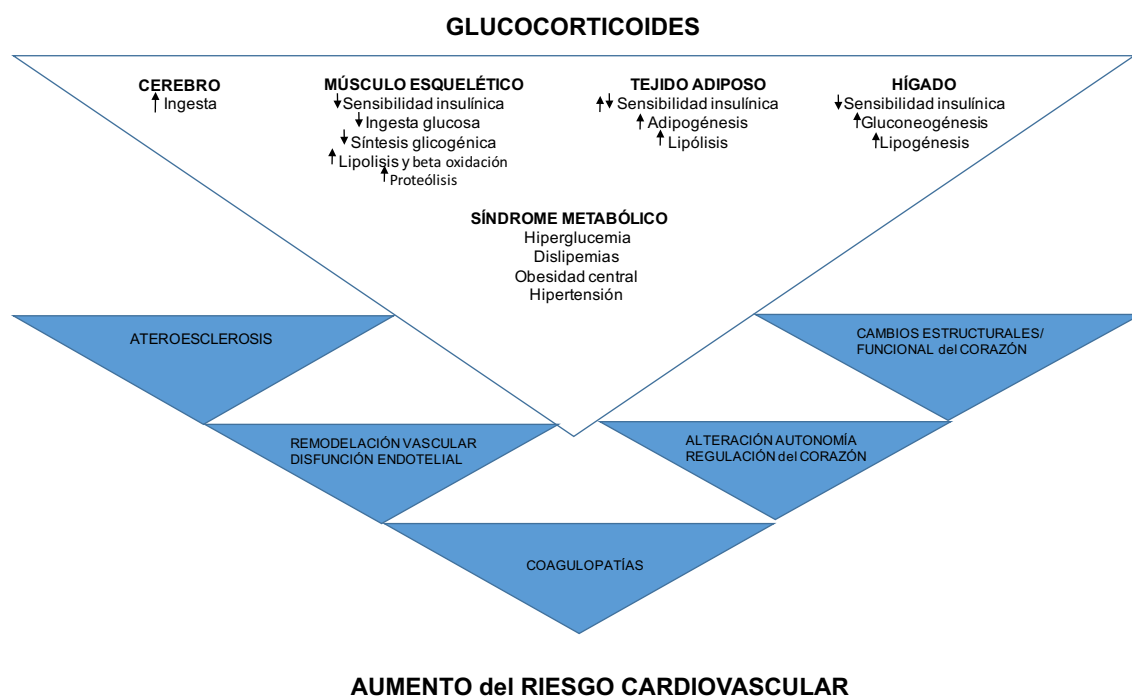


Figura 18. Riesgo cardiovascular en el síndrome de Cushing.
Adaptada de Ferrau F. et al. 2015.

Los principales factores de riesgos asociados al síndrome de Cushing, son:

- Hipertensión

Un 55-85% de los pacientes con síndrome de Cushing presentan hipertensión y ésta ha sido asociado con la duración de la enfermedad. Se ha demostrado que la hipertensión ha persistido incluso después de la remisión de la enfermedad entre el 24-56% de los casos, especialmente cuando los pacientes son mayores en el diagnóstico o tienen una amplia historia de hipercortisolismo o hipertensión de larga duración sin tratamiento (Feelders R.A. et al. 2012). Varios mecanismos pueden ser la causa de hipertensión en el síndrome de Cushing: actividad mineral corticoide del cortisol; activación del sistema renina-angiotensina; aumento de la reactividad cardiovascular a los vasoconstrictores; aumento de la sensibilidad del receptor β -adrenérgico a las catecolaminas; supresión del sistema vasodilatador; resistencia periférica total y renovascular; resistencia insulínica y apnea del sueño (Magiakou M.A. et al. 2010).

Las complicaciones con glucocorticoides pueden inducir a la síntesis del angiotensinógeno, aumentando la concentración del receptor tipo II de la angiotensina II en el cerebro y tejidos periféricos y aumentando la angiotensina II estimulada por las células vasculares del músculo liso y su acción central (Sato A. et al. 1994). Estas complicaciones glucocorticoideas inducidas, aumentan la eritropoyetina que contribuye a la vasoconstricción y por lo tanto a la hipertensión (Kelly J.J. et al. 2000).

Este aumento podría estar relacionado con el exceso de complicaciones glucocorticoideas induciendo un daño endotelial y aumento de la permeabilidad vascular, causando hipersecreción de endotelina en la circulación con el consecuente efecto permisivo aterogénico y constrictivo de la endotelina. El déficit de producción de vasodiladores, incluyendo prostaglandinas, prostaciclina y compuestos del sistema caliceína-cinina, puede también contribuir a la hipertensión en el síndrome de Cushing. Además, la hipertensión inducida por el cortisol se caracteriza por una reducida actividad de la vía del óxido nítrico (Wallerath T. 1999).

- Daño vascular

La remodelación vascular y el aumento del estrés oxidativo vascular juega un papel principal en las comorbilidades asociadas al síndrome de Cushing. Se ha demostrado que el área media del corte transversal de las arterias subcutáneas pequeñas es mayor en pacientes con síndrome de Cushing comparado con pacientes con hipertensión y sujetos sanos controles, (Rizzoni D. et al. 2009). En otro estudio se describió que los pacientes con síndrome de Cushing mostraban un aumento del grosor medio de la íntima de la carótida (Faggiano A. et al. 2003) y a un aumento de la disfunción endotelial (Baykan M. et al. 2007; Akaza I. et al. 2010). Las placas de ateroma son más prevalentes en pacientes con síndrome de Cushing, incluso después de la remisión del hipercortisolismo, y se correlaciona con la resistencia a insulina y la adiposidad central (Albinger N. et al. 2006).

- Morfología cardíaca

Se ha asociado al hipercortisolismo crónico cambios morfológicos cardíacos. Se ha mostrado que el 70% de los pacientes con síndrome de Cushing activo, presentan parámetros anormales en el ventrículo izquierdo: 42% presentan hipertrofia concéntrica y un 23%, remodelación concéntrica. Después de la remisión del hipercortisolismo, los parámetros del ventrículo izquierdo, mejoraron considerablemente, aunque no se normalizaron completamente (Toja P.M. et al. 2012).

En conjunto, todos estos estudios apuntan a que los pacientes con síndrome de Cushing muestran defectos en la función y estructura microvascular lo que puede contribuir al aumento de ECV en este grupo de pacientes. De forma importante, este daño microvascular se encuentra incluso en pacientes donde el hipercortisolismo asociado a Cushing ha remitido bien por cirugía bien por tratamiento farmacológico poniendo la relevancia de determinar y monitorizar a estos pacientes para la posible existencia de estos defectos vasculares durante su seguimiento habitual en las consultas de Endocrinología. Este ha sido uno de los objetivos de esta tesis: determinar si los pacientes con síndrome de Cushing curados muestran defectos en la función microvascular medida mediante flujometría por láser Doppler.

3.HIPÓTESIS

3. Hipótesis

La obesidad es el componente central y causal del síndrome metabólico, un conjunto de manifestaciones clínicas responsables de la disfunción endotelial que desencadena el proceso de aterosclerosis. El origen de la disfunción endotelial se ha relacionado con la alteración de la actividad endocrina del tejido adiposo así como con la existencia de un aumento sistémico y a nivel endotelial de radicales libres como las especies reactivas del oxígeno (ROS), las especies reactivas del nitrógeno (RNS), de la existencia de un entorno pro- inflamatorio e inflamatorio sistémicos y endotelial y finalmente con el desarrollo de la lesión ateromatosa y de la inestabilidad de la placa. La causa más frecuente de muerte en los pacientes obesos es la enfermedad vascular.

Estudios previos han demostrado que la función microvascular puede monitorizarse de una forma efectiva pero no invasiva mediante flujometría por láser Doppler. En este estudio planteamos que la función microvascular en individuos obesos (individuos con obesidad mórbida e individuos con obesidad asociada a síndrome de Cushing curados) se encuentra afectada y que esta alteración, puede ser detectado por la flujometría por láser Doppler, técnica no invasiva usada en nuestro hospital.

Por otra parte planteamos las hipótesis de que la función microvascular mejora en pacientes obesos mórbidos tras cirugía bariátrica.

4.OBJETIVOS

4. Objetivos

4.1. Objetivo principal

- Determinar la función microvascular mediante flujometría por láser Doppler en pacientes con obesidad mórbida antes de la cirugía bariátrica y a los 12 meses de la intervención.
- Determinar la función microvascular mediante flujometría por láser Doppler en pacientes con obesidad asociada a síndrome de Cushing curados.

4.2. Objetivos secundarios

- Estudiar la reproducibilidad de la flujometría por láser Doppler para la medida de la función microvascular en pacientes con obesidad mórbida.
- Determinar si la función microvascular en pacientes obesos mórbidos mejora tras la disminución de peso asociado a la cirugía bariátrica.
- Analizar la asociación entre la mejora de la función microvascular y la resolución de síndrome metabólico en pacientes con obesidad mórbida tras la cirugía bariátrica.
- Estudiar las comorbilidades asociadas al síndrome de Cushing curados y su relación con la función microvascular.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5. Material y método

La presente tesis doctoral, se sustenta de dos proyectos financiados que se adjuntan como Anexos, (Anexo I y II). Estos dos proyectos, contaron con la aprobación del Comité de Ética local del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, y por tanto a los participantes de los mismos, se les explicó el fin del proyecto, se les entregó la hoja de información al paciente para su lectura, comprensión y firma.

5.1. Sujetos del estudio

Todos los pacientes que participaron en este estudio, provienen de las consultas de la Unidad de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

En esta tesis, se ha trabajado con cuatro grandes grupos de sujetos:

- Pacientes con obesidad mórbida previa a cirugía bariátrica.
- Pacientes con enfermedad de síndrome de Cushing curados.
- Grupo de sujetos sanos.
- Grupo de sujetos sanos con sobrepeso, IMC entre 25 Kg/m² y 30 Kg/m².

Los pacientes con obesidad mórbida fueron seleccionados de la lista de espera de cirugía bariátrica de la Unidad de Cirugía del Hospital Universitario Virgen del Rocío entre Noviembre 2009 a Marzo 2011. Los pacientes con obesidad mórbida son evaluados por un equipo multidisciplinar formado por endocrinólogos, cirujanos y psiquiatras, que deciden si son aptos para la cirugía siguiendo el protocolo de intervención de cirugía bariátrica de nuestro hospital. Los criterios para indicación de cirugía bariátrica siguen las recomendaciones establecidas en las Guías clínicas estandarizadas del *National Institute of Health* (NIH) de los Estados Unidos (NHLBI. 1992; Fisher B. et al. 2002): pacientes con un IMC ≥ 40 Kg/m² o pacientes con IMC ≥ 35 Kg/m² pero que presentan ciertas comorbilidades como diabetes mellitus, hipertensión, cardiomiopatía dilatada o apnea del sueño.

En concreto, los criterios de inclusión para este estudio fueron:

- Pacientes, hombres o mujeres con edad comprendida entre 18-65 años.

- Conformidad a participar en el estudio dando su consentimiento y firmando correctamente el consentimiento informado.
- Estar bajo tratamiento farmacológico para las complicaciones de la obesidad con hipertensión arterial, diabetes mellitus, cardiomiopatías y apnea del sueño a la hora de la evaluación.

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes con enfermedad inflamatoria aguda o crónica.
- Existencia de trastorno psiquiátrico grave.
- Enfermedad maligna.
- Embarazo.
- Asma.
- Ausencia de pérdida ponderal tras cirugía.
- Cualquier historia clínica de abuso de alcohol y drogas.
- Período de seguimiento menor de 12 meses.

Según la definición de síndrome metabólico propuesta en el Tercer Informe del programa Nacional del colesterol del panel de expertos sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de niveles elevados de colesterol en adultos (Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. 2001), los pacientes deben cumplir al menos tres de los siguientes criterios:

1. Obesidad central, definida como un perímetro de la cintura > 102 cm en hombres o > 88 cm en mujeres.
2. Hipertensión arterial definida como presión arterial $\geq 130/85$ mmHg o uso de fármacos antihipertensivos.
3. Glucosa en ayunas ≥ 110 mg/dL.
4. Hipertrigliceridemia ≥ 150 mg/dL.
5. Colesterol lipoproteína de alta densidad (HDL) < 40 mg/dL en hombres ó < 50 mg/dL en mujeres.

Para el grupo control de sujetos sanos, se seleccionaron sujetos sanos, con un IMC establecido de IMC 25-35 kg/m², de edad comprendida entre 18-65 años, y sin enfermedades asociadas conocidas. Los individuos se reclutaron de acompañantes de pacientes obesos y de compañeros de trabajo del propio hospital, a los que se les proponía su participación (sin ningún incentivo económico) durante la evaluación de los sujetos obesos.

Para el estudio en pacientes con síndrome de Cushing curados, los pacientes seleccionados tenían que cumplir los siguientes criterios:

- Conformidad a participar en el estudio dando su consentimiento informado y firmando el mismo.
- Hombres o mujeres con edad comprendida entre 18-70 años.
- Haber tenido un síndrome de Cushing cualquiera que fuera su origen (hipofisario, adrenal o ectópico) que en el momento del inicio del estudio, llevara un tiempo de evolución mínimo desde la curación tras cirugía de seis meses. Se define por curación la normalización del cortisol libre urinario (CLU) (< 360 mol/L) en dos muestras de orina de 24 horas consecutivas y niveles de cortisol plasmático tras frenación nocturna con 1 mg de dexametasona menor de 50 nmol/L.

Los criterios de exclusión fueron:

- Pacientes con síndrome de Cushing curados en los que además de la cirugía se haya utilizado tratamiento con radioterapia hipofisaria.
- Presencia de hipopituitarismo, uno o más déficits hipofisarios distintos a hormona de crecimiento (GH).
- Abuso de alcohol u otro tipo de drogas.
- Mujeres embarazadas o en período de lactancia.
- Historia de trastorno psiquiátrico grave o enfermedad neurológica.
- Déficits visuales y daltonismo.

Para este estudio se utilizó un grupo control adicional, compuesto de individuos sanos pero que estuviera pareado con las características de pacientes con síndrome de Cushing, mayoritariamente mujeres, y con sobrepeso, con un IMC lo más parecido a los pacientes de síndrome de Cushing.

5.2. Diseño del estudio

- Estudio en pacientes con obesidad mórbida

Se diseñó un estudio prospectivo longitudinal de casos y controles. A cada paciente con obesidad mórbida se les realizaba pruebas analíticas, flujometría por láser Doppler y se tomaban sus medidas antropométricas previo a la cirugía y a los 12 meses tras la cirugía bariátrica.

Tal y cómo se muestra en la figura 19, antes de la cirugía bariátrica, los pacientes con obesidad mórbida se agruparon en dos sub-grupos:

- Pacientes obesos con síndrome metabólico (MetS^+) u obesos metabólicamente sanos.
- Pacientes obesos sin síndrome metabólico (MetS^-) u obesos metabólicamente enfermos.

Como pretendíamos evaluar el impacto de la resolución del síndrome metabólico en la función microvascular, a los 12 meses los pacientes obesos se dividieron en tres grupos para su comparación.

- Pacientes con síndrome metabólico previo a cirugía y que aún presentaban el síndrome metabólico tras cirugía bariátrica: pacientes $\text{MetS}^+/\text{MetS}^+$
- Pacientes con síndrome metabólico que tras cirugía no presentaban el síndrome metabólico: pacientes $\text{MetS}^+/\text{MetS}^-$
- Pacientes que previo a la cirugía no presentaban síndrome metabólico y que tras cirugía no presentaban el síndrome metabólico: pacientes $\text{MetS}^-/\text{MetS}^-$, destacando que no hubo ningún paciente que no presentara síndrome metabólico previo a cirugía y que desarrollara síndrome metabólico en los 12 meses tras la cirugía.

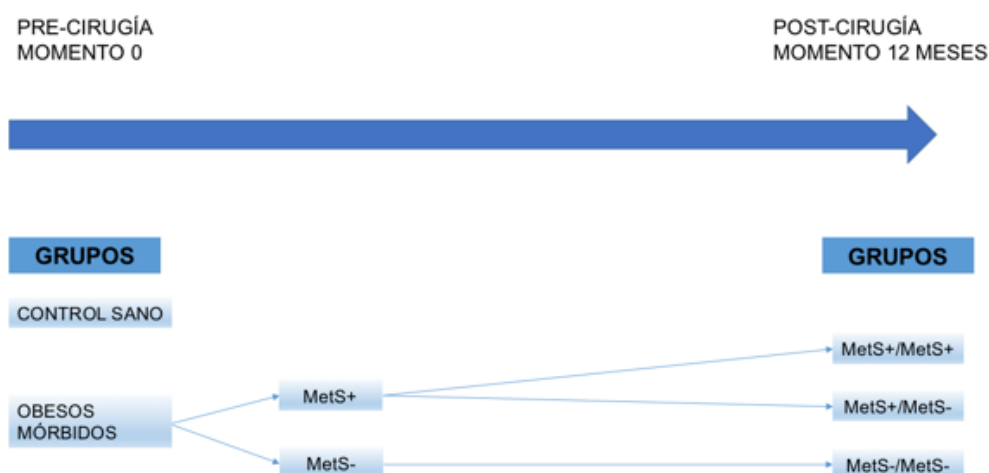


Figura 19. Diseño del estudio con obesos mórbidos. Seguimiento de los pacientes y los sujetos sanos antes de la cirugía y a los 12 meses de la misma. Los sujetos se clasifican en función de presencia o no del síndrome metabólico tanto antes como tras cirugía bariátrica.

- Estudio en pacientes con síndrome de Cushing curados

Se realizó un diseño transversal de casos controles constituido por pacientes con síndrome de Cushing (de origen hipofisario, adrenal o ectópico) curados que se comparó con un grupo de controles sanos con sobrepeso, pareado por sexo similar a lo encontrado en pacientes con síndrome de Cushing curados.

5.3. Realización de la flujometría por láser Doppler

Tal y como se explica en el punto 2.2.4 la flujometría por láser Doppler, es una técnica no invasiva que permite medir de forma indirecta la función endotelial o microvascular de la sangre. Esta técnica mide la vasodilatación dependiente del endotelio en arterias periféricas midiendo el incremento de la irrigación sanguínea de un tejido por restitución del flujo tras liberar la oclusión transitoria de una arteria. En nuestro caso, utilizamos la arteria braquial y el monitor Periflux System 5010 (figura 20). Este sistema consiste en una unidad que puede estar equipada con varias unidades funcionales: láser Doppler, presión de oxígeno/dióxido de carbono transcutánea ($\text{tcpO}_2/\text{tcpCO}_2$), temperatura y unidades de perfusión.

El monitor de PeriFlux System, debe estar colocado en un lugar adecuado, estable y cerca del paciente que va a ser estudiado. Hay que alejar el monitor lo más alejado posible de aparatos que emitan vibraciones como sistemas de ventilación, pues éstas pueden provocar artefactos en las medidas.



Figura 20. Sistema PeriFlux 5010 equipado con la Unidad de láser Doppler PF 5010 y Unidad de temperatura PF 5020.

- Preparación del sujeto y realización de la técnica

El sujeto debe estar preparado correctamente para evitar resultados erróneos. El sujeto deber venir descansado, relajado y hay que dejarlo aclimatarse al lugar donde se va a realizar la técnica durante al menos 30 minutos previo al inicio de la misma.

Antes de cada sesión de flujometría, los sujetos acudían en ayunas de más de 8 horas de duración y habiendo evitando haber consumido comidas ricas en sal durante al menos 12 horas. También se les recordaba que evitaran cualquier actividad física vigorosa que pudiera afectar a la reactividad micro vascular durante 48 horas previas a la cita. Se les pedía también que no consumieran sustancias ricas en cafeína y alcohol al menos 48 horas antes de acudir al centro para la realización de la técnica.

Se intentaba que las condiciones de la habitación donde se realizaba la técnica eran estables, manteniendo una temperatura ambiental constante de 22-25°C, evitando que hubiera corriente de aire frío que pudiera provocar una reducción significativa tanto de la temperatura de la piel como del flujo sanguíneo (Koyte A. et al. 2004; Liang T.C.M. et al. 2000).

El proceso y las condiciones para realizar la flujometría por láser Doppler fueron las siguientes:

- Explicar al paciente el procedimiento que se les iba a realizar. Insistir en la importancia de que estuvieran relajados, en posición cómoda y sin movimiento durante el registro los datos de la flujometría por láser Doppler.
- Colocar un manguito de presión arterial en el antebrazo del paciente y por encima del codo, evitando que no pillara flexura de la piel ni ropa. La piel del paciente, tenía que estar en contacto directo con el esfigmomanómetro.
- Tomar y registrar la tensión arterial del paciente, para que tuviéramos un valor de referencia.
- Colocar al paciente con el brazo hacia arriba, solicitándole que se pusiera en posición cómoda, y evitando que se moviera durante todo el proceso.
- Colocar el sensor láser a la piel en la parte interna del brazo y fijarlo con los adhesivos apropiados de manera que no hubiera posibilidad de desplazarse al hinchar el esfigmomanómetro.
- Asegurarse de que los cables de fibra óptica no estén cerca de objetos que pueden colisionar o moverse para evitar posibles artefactos en la señal que se trasmite al registro del ordenador tal y como aparece en la figura 21.

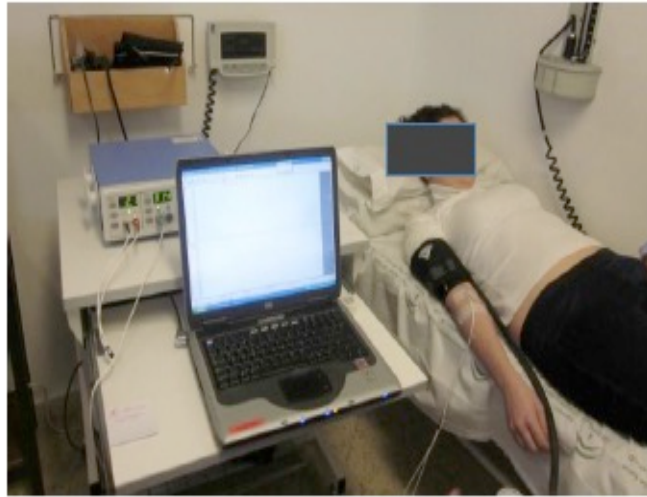


Figura 21. Colocación del paciente y el sensor para la realización de la técnica de flujometría por láser Doppler.

- Comprobar que el sensor está transmitiendo la señal y esperar hasta que las Unidades de Perfusión (UP) se mantengan estables y constantes durante al menos 1-2 minutos.
- Iniciar la técnica registrando los datos.
- Mantener 1 minuto de registro basal, y al cabo del mismo, provocar la oclusión, inflando rápidamente el manguito del tensiómetro entre valores de 180-200 mm/Hg.
- Mantener esta presión durante 4 minutos observando la coloración de la piel, dolor y dedos del paciente, de manera que no hubiera ningún problema.

- Liberar, transcurridos estos 4 minutos, el aire del manguito del tensiómetro lo más rápido posible, provocando una reacción de hiperemia, al aumentar el flujo de perfusión de su estado de reposo (Figura 22).

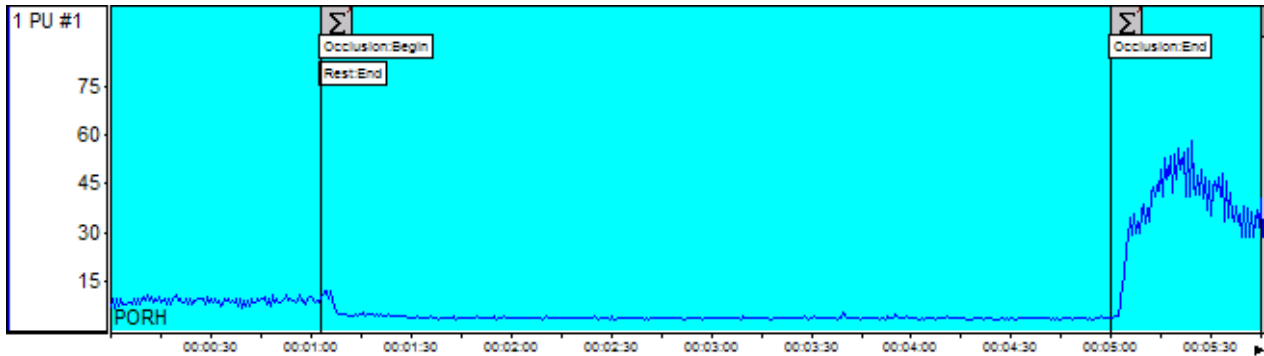


Figura 22. Representación gráfica del registro de Unidades de Perfusión y momento de oclusión y liberación del esfigmomanómetro.

- Continuar el registro de los valores de UP hasta que éstos lleguen a su estado inicial de reposo/basal (Figura 23)

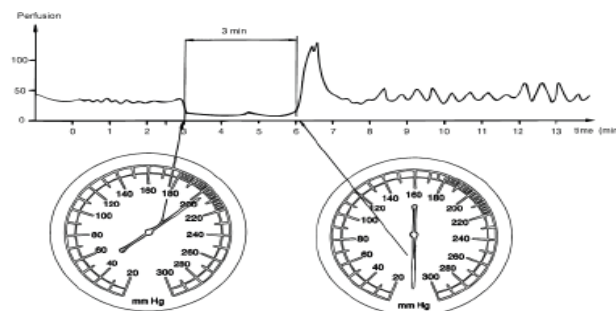


Figura 23. Representación gráfica de la flujometría por láser Doppler

- Retirar el manguito de la tensión arterial y comprobar que el paciente se encuentra bien.

Durante todo el estudio el software del equipo registra los parámetros que evalúan la perfusión, desde el punto previo a la isquemia hasta el de finalización del estudio, realizando dos tipos de análisis:

- A. Análisis general: informa del valor inicial, valor máximo recogido, valor al final del estudio, porcentaje de cambio del primer valor al último o al máximo, pendiente de la curva y área bajo la curva.
- B. Análisis específico de PORH: calcula el cero biológico, el pico del flujo, el área de hiperemia, el tiempo hasta la máxima hiperemia, el tiempo hasta alcanzar la mitad de la máxima hiperemia y el tiempo de latencia.

Como se ha explicado en la introducción, el análisis específico de PORH, es el que proporciona las variables más relevantes para determinar la función microvascular. En concreto, en nuestro estudio analizamos las siguientes variables (figura 24):

- Área de Oclusión (AUC_O)
- Área de Hiperemia (AUC_H)
- $PORH_{PEAK}$ es el punto más alto que alcanza la respuesta de PORH sobre el cero biológico.
- $PORH_{MAX}$ es la diferencia entre el $PORH_{PEAK}$ y el valor medio basal.
- Valor medio basal, es el valor basal antes de la oclusión durante el período de reposo.

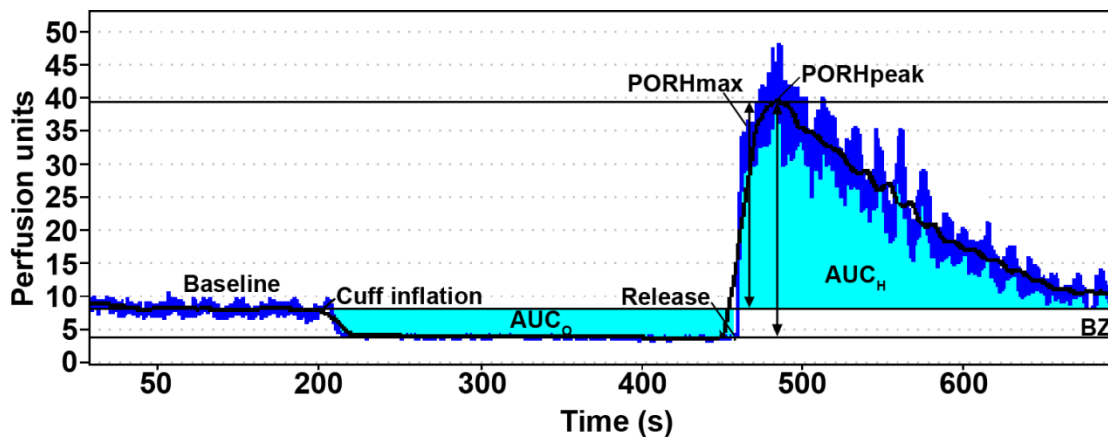


Figura 24. Ilustración esquemática de los parámetros relevantes analizados en la reacción de hiperemia. Abreviaturas: incremento máximo del flujo en la perfusión de hiperemia ($PORH_{MAX}$); tiempo para alcanzar el pico del flujo (T_P); amplitud del pico de perfusión del flujo ($PORH_{PEAK}$).

Fuente. J.F. Martín-Rodríguez et al. 2014.

5.4. Reproducibilidad de la técnica

Para determinar la reproducibilidad de la técnica en pacientes obesos mórbidos se les realizó la prueba en el mismo día en las mismas condiciones, tres veces con un periodo de descanso de 15 minutos entre cada una de ellas. Este análisis se realizó antes de la cirugía y a los 12 meses después de la intervención. El tratamiento de los datos obtenidos se describe más abajo en el apartado de métodos estadísticos.

5.5. Variables del estudio

5.5.1. Variables dependientes

En cada grupo de pacientes, se analizarían una serie de variables en función de las características de los pacientes (obesos mórbidos y síndrome de Cushing curados) y las comorbilidades asociadas. Algunas de estas variables, coinciden entre patologías, pero otras varían en relación a la patología.

En pacientes con obesidad mórbida fueron:

- Sexo.
- Edad.
- Medida de la presión arterial.
- Comorbilidades: diabetes, hipertensión e hipercolesterolemia.
- Tratamiento farmacológico para estas comorbilidades.
- Tipo de cirugía.
- Medidas antropométricas: índice de masa corporal (IMC), perímetro de la cintura (medido en el punto de máxima circunferencia).
- Parámetros bioquímicos: colesterol total, colesterol lipoproteína de baja densidad (LDLc), y colesterol lipoproteína de alta densidad (HDLc) y triglicéridos.
- Presencia de síndrome metabólico: cuando existan al menos 3 de los cinco criterios definidos por la American Heart Association (AHA).

En pacientes con síndrome de Cushing curados fueron:

- Edad.
- Sexo.
- Comorbilidades: diabetes, hipertensión e hipercolesterolemia.
- Medidas antropométricas: IMC, perímetro de la cintura.
- Medida de la presión arterial.

5.5.2. Variables independientes

Para ambos grupos, se medirán los parámetros que se analizan con la flujometría por láser Doppler. Como ya se ha desarrollado con anterioridad, el análisis de la flujometría por láser Doppler se llevará a cabo mediante un análisis internos del programa que analizará diferentes parámetros de la flujometría, centrándose sobre todo en las principales variables del análisis de la PORH.

De este análisis, aparecerán los siguientes parámetros:

- Área de Oclusión (AUC_O).
- Área de Hiperemia (AUC_H).
- $PORH_{PEAK}$.
- $PORH_{MAX}$.
- Valor medio basal.
- Cero biológico (BZ).
- Peak Flow (PF).

5.6. Análisis estadístico

5.6.1. Métodos generales

Los datos se muestran como media y desviación estándar a menos que se indique lo contrario. La normalidad de la distribución de la variable se determinó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Para las variables cuantitativas se utilizó el test X^2 . Para la comparación entre grupos de variables cuantitativas, Si los datos se distribuían con normalidad se utilizó el test de ANOVA seguido por test t-de Student. En variables con

distribución no normal se utilizó el test de Kruskal-Wallis seguido por comparaciones *post hoc* con el test de Mann-Whitney. Para evaluar los cambios tras cirugía bariátrica en pacientes obesos mórbidos se utilizó el two-way ANOVA para medias repetidas con comparaciones *post hoc* de Tukey. Para evaluar el grado de correlación de las diferentes variables cuantitativas se usó el coeficiente de correlación de Pearson si los datos seguían una distribución normal o el de Spearman en caso contrario. Se consideró significativa una *p* mayor de 0.05.

5.6.2. Reproducibilidad de la técnica

Para estudiar la reproducibilidad de la técnica, se utilizaron dos métodos estadísticos, uno numérico de coeficiente de correlación intraclase (ICC) (Fleiss JL. 1986) y otro gráfico, el método de Bland & Altman.

La correlación intraclase, utiliza unos valores que fluctúan entre 0 y 1. Los valores más cercanos a 1 representan una reproducibilidad más fuerte, y los más cercanos a 0, menos.

Se presentan en la tabla 7, la relación entre los valores de ICC y la fuerza de la concordancia.

Tabla 7. Representación valores de fuerza de concordancia

Valor ICC	Fuerza de la concordancia
> 0,90	Muy buena
0,90 – 0,71	Buena
0,70 – 0,51	Moderada
0,50 – 0,31	Mediocre
< 0,30	Mala o nula

También se utilizó el método de Bland & Altman para examinar la posible existencia de sesgo y determinar la precisión de la técnica mediante comparación entre estudios. El método gráfico de Bland & Altman, propuesto en 1986 (Bland J.M. et al. 1986; Bland J.M. et al. 1999) es un método gráfico sencillo que evalúa la concordancia entre dos variables

cuantitativas, y cuyo uso ha ido en aumento en los últimos años. Este procedimiento, descrito en detalle en 1986 resulta útil en estudios de comparación de dos métodos, o en estudios de fiabilidad de un único método, cuando se realizan dos mediciones repetidas a una serie de sujetos con el método de evaluar.

El método consiste en representar gráficamente, en un diagrama de dispersión, la media de las dos mediciones, como la mejor estimación del verdadero valor, frente a la diferencia absoluta entre los dos valores. El gráfico incluye además, una línea horizontal en la diferencia media y dos líneas, llamadas líneas de concordancia, a una distancia de 1,96 desviaciones estándar por arriba y por debajo de la primera. Si las diferencias entre los pares de observaciones siguen aproximadamente una distribución normal y los valores tienden a ser estables en todo el rango de medición, se espera que el 95% de esas diferencias caigan dentro de los límites de concordancia.

6.RESULTADOS

6. Resultados

6.1. Reproducibilidad de la flujometría por láser Doppler en pacientes con obesidad mórbida

Como se ha comentado en la Introducción, antes de realizar el estudio propiamente dicho quisimos confirmar que la técnica de flujometría por láser Doppler era reproducible en pacientes con obesidad mórbida, un aspecto que no había sido estudiado previamente.

El estudio de la reproducibilidad consistió en la realización de la flujometría por láser Doppler tres veces a los pacientes en las mismas condiciones establecidas en el punto 5.3, y dejando un tiempo de 15 minutos entre prueba. El mismo procedimiento, se realizó al año tras cirugía en los mismos pacientes. La prueba se realizó a 62 sujetos obesos mórbidos, antes de la cirugía y a los 12 meses de la misma.

En primer lugar, para el análisis de reproducibilidad, se calculó el coeficiente de correlación intraclase (CCI) de nuestras principales variables de estudio de la función microvascular que la flujometría por láser Doppler nos proporciona (tabla 8). Estas variables fueron: $PORH_{PEAK}$, $PORH_{MAX}$, AUC_O y AUC_H .

Tabla 8. Resultados del coeficiente de correlación intraclase (CCI) previo y tras 12 meses de la cirugía bariátrica.

VARIABLES	CCI antes de la cirugía bariátrica	CCI después de la cirugía bariátrica
$PORH_{PEAK}$	0.88 (0.83-0.92)	0.93 (0.89-0.95)
$PORH_{MAX}$	0.88 (0.81-0.92)	0.92 (0.88-0.95)
AUC_O	0.81 (0.72-0.88)	0.81 (0.71-0.87)
AUC_H	0.83 (0.75-0.89)	0.91 (0.86-0.94)

Siguiendo los criterios de fuerza de concordancia explicados en el punto 5.6.2 de material y método, antes de la cirugía, todas las variables mostraron una reproducibilidad buena (CCI: 0,71-0,90). En algunos casos, como la $PORH_{PEAK}$ y $PORH_{MAX}$, estuvieron cerca de una fuerza de concordancia muy buena, pues alcanzaron cifras de 0.88. Cuando la

prueba de flujometría por láser Doppler, se repitió al año de la intervención, obtuvimos una mejora en la mayoría de las variables, mostrando una fuerza de concordancia mayor de 0.90, es decir, muy buena, exceptuando la variable AUC_O cuyo valor fue de 0.81 y se mantuvo en la categoría "buena".

En segundo lugar, realizamos el estudio de la reproducibilidad por el método de Bland & Altman. Antes de la cirugía, cuando se analizaban las medias de los ratios entre las distintas variables ($PORH_{PEAK}$, $PORH_{MAX}$, AUC_O y AUC_H), éstos estaban cercanos a 1, y en más del 95%, las observaciones se situaban en los márgenes $\pm 1,96$ DT tal y cómo se aprecia en la figura 25.

De manera visual y gráficamente, se apreciaban como todas las medidas analizadas, estaban cerca de la media, y muy pocos valores, estaban fuera de los márgenes establecidos. Los casos identificados fuera de estos márgenes no fueron considerados para el análisis de la reproducibilidad.

Cuando se analizaban las gráficas, se apreciaba como el parámetro AUC_H representaba, visualmente la peor variable, con 6 valores fuera de los límites establecidos cuando se analizaban el $AUC_H 1$ y $AUC_H 2$, 5 valores entre el $AUC_H 1$ y $AUC_H 3$ y 3 entre $AUC_H 2$ y $AUC_H 3$. El resto de las variables, y exceptuando la gráfica de $PORH_{MAX} 1$ y $PORH_{MAX} 2$, que tenía 5 valores fuera de los rangos, tenían todos sus valores menos dos o tres, dentro del límite establecido.

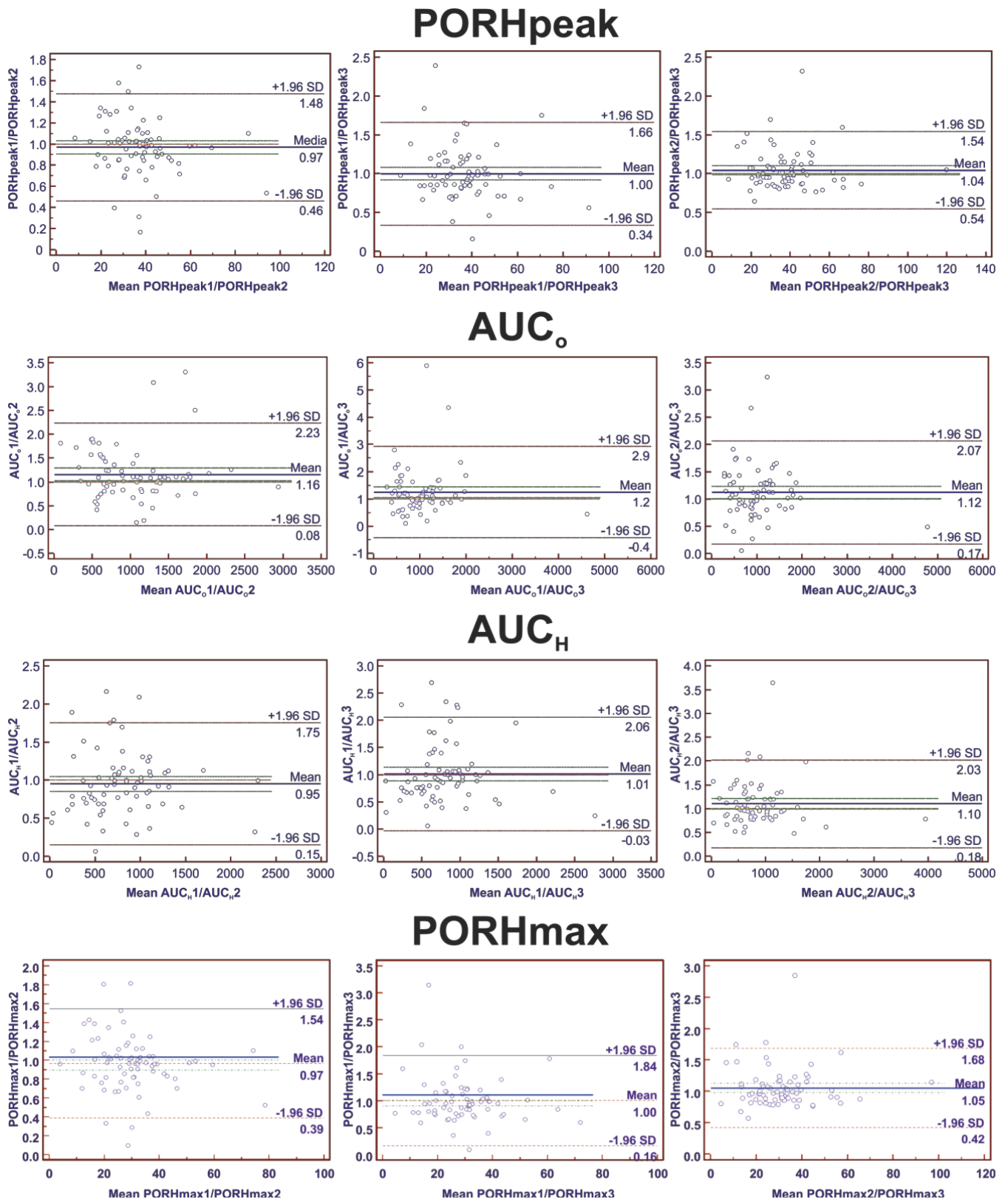


Figura 25. Reproducibilidad de los parámetros función micro vascular en pacientes obesos antes de la cirugía bariátrica. Se registraban tres medidas: momento 0, a los 15 minutos y a los 30 minutos.

Al realizar el mismo análisis al año tras cirugía observamos una mejora en la reproducibilidad comparado con los datos previos a cirugía bariátrica, igual que ocurría con el ICC.

Analizando las gráficas de Bland & Altman y tal y como se muestra en la figura 26, en el caso de $PORH_{PEAK}$, se apreciaba como solamente dos valores cuando se comparaba $PORH_{PEAK1}$ y $PORH_{PEAK2}$ y $PORH_{PEAK2}$ y $PORH_{PEAK3}$, estaban fuera de los límites establecidos. Entre $PORH_{PEAK1}$ y $PORH_{PEAK3}$, solamente hubo 3 casos.

El resto de las variables, presentaban también muy buenos resultados, pues la mayor parte de los valores analizados, estaban entre los márgenes $\pm 1,96$ DT establecidos como límites para el estudio de la reproducibilidad. Se podría destacar, que solamente la variable en la que se apreciaban más valores fuera de los límites establecidos, fue AUC_{H2} y AUC_{H3} , con 5 valores, pero insuficiente como para asegurar que ese parámetro no era reproducible por sí mismo.

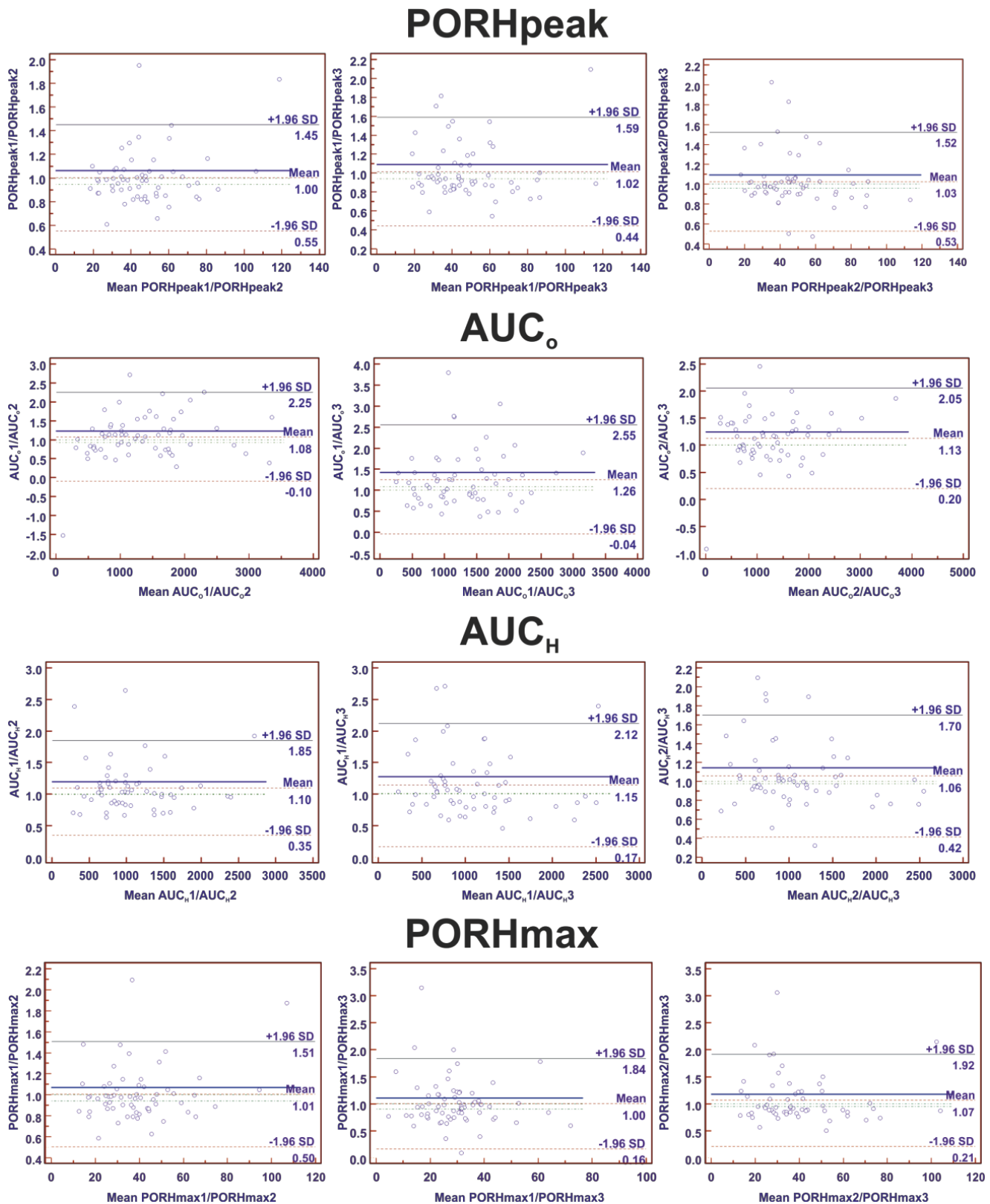


Figura 26. Reproducibilidad de los parámetros de función micro vascular en pacientes obesos después de la cirugía bariátrica (12 meses). Se registraban tres medidas: momento 0, a los 15 minutos y a los 30 minutos.

Basado en estos resultados, podemos asegurar que las variables analizadas eran reproducibles tanto antes de la cirugía como a los 12 meses después de la cirugía y por tanto valida el uso la técnica de flujometría por láser Doppler para analizar la función endotelial en pacientes con obesidad mórbida.

6.2 Impacto de la cirugía bariátrica en la función microvascular de pacientes con obesidad mórbida

6.2.1. Características clínicas de la cohorte de pacientes con obesidad mórbida y grupo control sin obesidad

Un total de 62 pacientes (53 mujeres, rango de edad 19-65 años) completaron el periodo de seguimiento de 12 meses. Estos pacientes, por supuesto, como se ha descrito en material y métodos cumplieron todos los criterios de inclusión, incluyendo la firma del consentimiento informado.

Como grupo control de individuos sanos no obesos, pudimos reclutar un total de 30 sujetos, 22 mujeres y 8 varones con una media de 37 ± 11 años que presentaban un IMC medio de $24.8 \pm 5 \text{ Kg/m}^2$, valores clasificado como normopesos. El resto de los parámetros analizados estaban ajustados a la normalidad tal y cómo se aprecia en la tabla 8 con todas las variables analizadas.

Los datos clínicos y metabólicos de los pacientes obesos antes de la cirugía así como de los individuos sanos controles se muestran en la tabla 9. Los pacientes obesos se dividieron en dos subgrupos según la presencia del síndrome metabólico (Ob/MetS+) o no (Ob/MetS-) siguiendo el diseño del estudio.

En nuestra cohorte observamos un mayor porcentaje, un 63% de pacientes obesos con síndrome metabólico (Ob/MetS+) respecto a obesos sin síndrome metabólico (Ob/MetS-) con 23 casos, un 37% de sujetos.

Las mujeres con MetS+ fue el grupo más representativo con 34 casos, un 55% de los casos.

Tampoco fue significativo frente al grupo control sano, cuya edad media fue inferior en ambos grupos.

No hubo diferencias significativas de edad y sexo comparando los tres grupos, sin embargo, de las medidas antropométricas: IMC, circunferencia de la cintura y de la cadera, variables que fueron significativas, lo que nos indicaba que entre los tres grupos, sí que había diferencias.

Al comparar los tres grupos, todas las variables fueron significativas exceptuando el género, la edad, el uso de inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA) o bloqueadores de los receptores de la angiotensina II (ARB) y el colesterol total, algo totalmente esperado por las características de los grupos y las diferencias que entre ellos había.

Cuando se analizaron las variables del grupo Ob/MetS+ frente al grupo control, y con el grupo de Ob/MetS-, las únicas variables que no fueron significativas entre ninguno de los grupos, fueron el género y la edad. El resto de parámetros tuvieron una significancia entre uno u otro grupo.

Al comparar los grupos de Ob/MetS entre ellos, y con el grupo control de sujetos sanos, que era sin duda a duda, la parte más interesante de los resultados, las variables clínicas estudiadas, mejoraban en función de la presencia de que los pacientes tuvieran síndrome metabólico o no, exceptuando los parámetros antropométricos de perímetro de cintura y cadera que sorprendentemente eran mayores, 134.4 ± 14 cm y 149.2 ± 12 cm respectivamente en el grupo de Ob/MetS- frente a 133.2 ± 13 cm y 147.5 ± 11 cm del grupo Ob/MetS+. El IMC, solamente fue significativo cuando se comparaban los grupos de Ob/MetS con el grupo control, pero sin embargo no hubo diferencias significativas entre ellos.

En el caso de la tensión arterial sistólica, el valor del grupo Ob/MetS+ fue significativo con respecto al grupo de Ob/MetS- y el grupo control sujetos sanos, con un valor medio de 137 ± 17 mm/Hg. lo que indicaba que entre ellos, había diferencias significativas. En cambio, la tensión arterial diastólica y la frecuencia cardiaca, solamente fueron significativas cuando

se comparaban con el grupo control de sujetos sanos, sin que hubiera diferencias entre los grupos de Ob/MetS.

Como se esperaba, hubo una alta prevalencia de diabetes mellitus e hipertensión arterial en el grupo de Ob/MetS+ por la propia definición de síndrome metabólico, encontrándonos un 33% de sujetos con diabetes mellitus y un 66% de pacientes con hipertensión arterial, variables significativas con una $p < 0.001$ al compararlo con el grupo control de sujetos sanos. Hay que destacar el porcentaje (32%) de pacientes Ob/MetS- que presentaban hipertensión arterial, que no presentaban diferencias significativas con ningún grupo, pero que como única comorbilidad, estaba presente en este grupo de pacientes.

En relación a la medicación que estaban tomando relacionada con las comorbilidades asociadas, en el grupo de Ob/MetS+, había un 23% de pacientes tomando hipoglicemiantes, que presentaban diferencias significativas con respecto al grupo Ob/MetS-, mientras que en relación al uso de IECAs o ARBs, había un 38% de los pacientes Ob/MetS+ que estaban tomando medicación y presentaban diferencias frente al grupo control de sujetos sanos. En el grupo de sujetos Ob/MetS-, hubo un 18% de pacientes que estaban tomando IECAs o ARBs, pero que no presentaban ninguna diferencia al compararse tanto con el grupo de control sano como con el grupo de Ob/MetS+.

En relación a los parámetros analíticos analizados, los valores estuvieron dentro de lo esperado en función de la presencia o no de patología asociada. El colesterol total medio, fue mayor en el grupo de Ob/MetS+ con un valor medio de 202.8 ± 41.3 mg/dL. siendo una variable significativa cuando se comparaba el valor medio con respecto al grupo control de sujetos sanos y frente al grupo de Ob/MetS-, con un $p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente.

Mientras que el LDLc y los triglicéridos fueron los únicos parámetros analíticos que en el grupo de Ob/MetS+ fueron significativos cuando se compararon tanto con el grupo control sano como con el grupo Ob/MetS-.

El HDLc medio, fue la única variable analítica que no fue significativa entre los grupos de obesos, presentando un valor medio de 44.8 ± 10.7 mg/dL. en el grupo de Ob/MetS+, un valor muy acorde con la situación metabólica de los sujetos.

Tabla 9. Características clínicas pacientes con obesidad mórbida antes de la cirugía y grupo control

VARIABLES	Ob/MetS-	Ob/MetS+	control sujetos sanos	Valor p
Número (%)	23 (37)	39 (63)	30 (100)	n/a
Género (Mujeres/Varones)	19 (30,5) /4 (6,5)	34 (55)/5 (8)	22/8	0.336
Edad (años)	40 ± 9	42 ± 10	37 ± 11	0.109
IMC [peso (kg)/[altura (m)] ²]	49.4 ± 5 ^{***}	50.7 ± 5 ^{***}	24.8 ± 5	<0.0001
Circunferencia de la cintura (cm)	134.4 ± 14 ^{***}	133.2 ± 13 ^{***}	80.4 ± 11	<0.0001
Circunferencia de la cadera (cm)	149.2 ± 12 ^{***}	147.5 ± 11 ^{***}	101.8 ± 8	<0.0001
Tensión arterial sistólica (mm/Hg)	128 ± 15 ^{**}	137 ± 17 ^{***†}	116 ± 8	<0.0001
Tensión arterial diastólica (mm/Hg)	76 ± 11 ^{***}	79 ± 11 ^{***}	65 ± 6	<0.0001
Frecuencia cardiaca	82 ± 8 ^{***}	81 ± 8 ^{***}	66 ± 6	<0.0001
Diabetes mellitus (%)	0	33 ^{†††}	0	<0.0001
Uso hipoglicemiantes (%)	0	23 ^{†††}	0	<0.0001
Hipertensión arterial (%)	32	66 ^{†††}	0	<0.0001
Uso IECA o ARB (%)	18	38 ^{††}	0	0.002
Colesterol total (mg/dL)	179.4 ± 36.7	202.8 ± 41.3 ^{***†}	173.3 ± 29.1	0.003
LDLc (mg/dL)	116.8 ± 18.5	139.0 ± 35.8 ^{***†}	103.8 ± 25.4	<0.0001
HDLc (mg/dL)	50.6 ± 13.2	44.8 ± 10.7 ^{***}	55.6 ± 10.07	<0.0006
Triglicéridos (mg/dL)	98.7 ± 35.6	134.0 ± 60.8 ^{***†}	68.9 ± 23.4	<0.0001

Abreviaciones: Ob/MetS-: obesos sin síndrome metabólico; Ob/MetS+: obesos con síndrome metabólico; n/a: no aplica; cm: centímetro; mm/Hg: milímetro/mercurio; lpm: latidos por minutos; IECA: inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina; ARB: bloqueadores de los receptores de la angiotensina II; mg: miligramos; dL: decilitros.

Los datos están expresados como medias ± desviación estándar (SD). Comparación *post-hoc* vs sujetos control sano *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Comparación *post-hoc* versus Ob/MetS- †p< 0.05, ††p< 0.01, †††p< 0.001.

6.2.2. Medida de la PORH por láser Doppler en pacientes con obesidad mórbida previa a la cirugía bariátrica

Como ya se ha comentado en la introducción, dentro de las múltiples variables que se pueden obtener en la evaluación de la hiperemia reactiva posisquemia por láser Doppler, nos decidimos centrar en cuatro de las variables por su potencial relevancia biológica: $PORH_{PEAK}$, $PORH_{MAX}$, AUC_O y AUC_H . Estos resultados, se presentan en la tabla 10.

La variable AUC_H fue la única variable que mostró diferencias significativas entre los tres grupos. AUC_H fue significativamente menor en ambos grupos de pacientes obesos comparados con el grupo de controles sanos. Sin embargo no hubo diferencias significativas de AUC_H entre los dos grupos de pacientes con obesidad ($p=0.958$).

Tabla 10. Parámetros hiperemia reactiva posisquemia en arteria braquial por láser Doppler en pacientes obesos antes de la cirugía bariátrica y controles sanos

VARIABLES	Ob/MetS-	Ob/MetS+	Control Sano	Valor p
Número de sujetos	23	39	30	n/a
PORH peak	35.9 ± 16	36.5 ± 16	42.5 ± 13	0.214
PORH max	29.1 ± 15	29.1 ± 15	35.0 ± 12	0.184
AUC_O	1002.4 ± 436	990.2 ± 510	1124.8 ± 462	0.486
AUC_H	734.2 ± 441 [*]	767.4 ± 448 [*]	1041.5 ± 455	0.022

Abreviaturas: Ob/MetS-: pacientes obesos sin síndrome metabólico; Ob/MetS+: pacientes obesos con síndrome metabólico; n/a: no aplicable;

Los datos están expresados como medias ± desviación estándar (SD).

Comparación Post-hoc vs sujetos controles. * $p<0.05$

Por tanto, nuestros resultados indican que los pacientes con obesidad mórbida muestran una disminución de la función microvascular comparado con sujetos sanos no obesos.

6.2.3. Características clínicas de la cohorte de pacientes con obesidad mórbida al año de la cirugía bariátrica

Para evaluar el impacto de la pérdida de peso asociada a la cirugía bariátrica sobre la función microvascular se volvieron a realizar los mismas evaluaciones al año tras la cirugía. Uno de los efectos más obvios de la cirugía bariátrica es la pérdida de peso hasta la mitad del tejido adiposo en el primer año después de la cirugía con mejoras en el metabolismo sistémico (Galanakis C.G. et al. 2014). Este es un periodo de tiempo que basado en la experiencia previa de la Unidad de Endocrinología y con las publicaciones científicas, es suficiente para observar una pérdida significativa de peso en los pacientes y por tanto, para evaluar su función microvascular.

A los pacientes se les repetía los mismos procedimientos que en la visita pre-cirugía, es decir, analítica bioquímica, medida de constantes vitales, y variables antropométricas además de realizar la flujometría por láser Doppler.

De los 62 pacientes, a 45 pacientes se les realizó una gastrectomía tubular laparoscópica y a 17 pacientes un bypass gástrico en Roux. Es importante señalar que no observamos diferencias significativas de pérdida de peso entre las dos técnicas ($p=0.22$) por lo que se trató a todos los pacientes como un único grupo.

La gran diferencia entre el número de mujeres y varones de nuestra cohorte (85.5% mujeres) está de acuerdo con estudios previos que muestran que las mujeres tienen mayor predisposición a someterse a cirugía bariátrica que los hombres (Samuel I. et al. 2006). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de estudios en relación de género y tipo de cirugía ($p=0.798$ y $p=0.963$, respectivamente).

Todos los datos clínicos y metabólicos de los pacientes del año de la cirugía se muestran en la tabla 11.

Uno de nuestros objetivos de esta tesis es determinar el impacto específico del síndrome metabólico sobre la función microvascular. Siguiendo el diseño del estudio (ver figura 18) los pacientes obesos al año tras cirugía se dividieron en tres grupos dependiente

de la resolución de síndrome metabólico tras cirugía. Así, los tres grupos que presentamos fueron:

- Pacientes que no presentaban síndrome metabólico previamente a la cirugía y que al año seguían sin presentar síndrome metabólico (MetS-/MetS-).
- Pacientes que presentaban síndrome metabólico previamente a la cirugía y que al año tras cirugía no presentaban síndrome metabólico. (MetS+/MetS-).
- Pacientes con síndrome metabólico previamente a la cirugía que al año tras cirugía y a pesar de una importante pérdida de peso, continuaban con síndrome metabólico (MetS+/MetS+).

La cirugía bariátrica consiguió la resolución de síndrome metabólico en 27 pacientes (43,55%) y redujo de forma muy significativa, los valores antropométricos en todos los pacientes. Hay que resaltar que observamos una media de la disminución de IMC de unos 15 puntos, reafirmando la eficiencia de este tipo de intervenciones sobre la pérdida de peso. Sin embargo, también hay que resaltar que a pesar de una pérdida de peso significativa, los pacientes MetS+/MetS+ mostraban un mayor IMC que los pacientes MetS-/MetS-. Igualmente, aunque tanto el perímetro de la cintura como de la cadera mejoró significativamente en todos los grupos de obesos tras la cirugía, los pacientes MetS+/MetS+ mostraban una un mayor perímetro comparado con los dos otros grupos de pacientes obesos.

La cirugía bariátrica resultó en un descenso de la presión arterial diastólica y frecuencia cardiaca en pacientes MetS+/MetS-. En relación a las comorbilidades asociadas al año de la intervención se observó un descenso del número de pacientes con diabetes mellitus, pasando de 5 pacientes previo a la cirugía bariátrica a ninguno en el grupo MetS+/MetS-.

De igual manera, para la hipertensión arterial, en el grupo MetS+/MetS-, hubo 7 pacientes que presentaban la misma tras 12 meses después de la cirugía bariátrica, presentando una disminución de 7 casos, un 50% de mejor antes de la cirugía. Hay que destacar que en el grupo MetS-/MetS- había un paciente que presentaba hipertensión

arterial, previos a la cirugía. Mientras, en el grupo de MetS+/MetS+, al igual que en el grupo de MetS+/MetS-, también hubo 7 casos que presentaban hipertensión arterial, con el sentido lógico al ser éste un grupo de pacientes con presencia de síndrome metabólico.

Cuando se compararon los datos de presencia de diabetes mellitus e hipertensión arterial entre los tres grupos, hubo diferencias significativas en el grupo de MetS+/MetS-, donde se supone que hubo una mejoría del síndrome metabólico. Cuando se compararon los datos, entre ellos, uno por uno, la diabetes mellitus y la hipertensión arterial, fue significativa cuando se comparó el grupo MetS+/MetS- con los otros dos grupos de pacientes obesos, presentado un $p < 0.05$ entre todos los grupos. En relación al uso de medicación para el control de la diabetes mellitus y la hipertensión arterial, en el grupo MetS+/MetS- hubo una clara mejoría, con una disminución del 50% de casos. En el caso de los fármacos hipoglucemiantes, los 5 pacientes que antes tomaban la medicación en el grupo MetS+/MetS- dejaron de tomarla al año, mientras que en el grupo MetS+/MetS+ los 3 pacientes que tomaban medicación previo a la cirugía seguían manteniendo esta medicación al año.

Respecto las variables analíticas, todos los grupos de pacientes redujeron sus niveles de insulina en ayunas. Se observó una mejora en los niveles de glucosa en ayunas, colesterol total, LDLc, HDLc y triglicéridos en los grupos MetS-/MetS- y MetS+/MetS- pero no en el grupo MetS+/MetS+.

La comparación entre los tres grupos de obesos mostró mayores niveles de glucosa e insulina en ayunas y triglicéridos en el grupo MetS+/MetS+ respecto a los dos otros grupos. Igualmente el grupo MetS+/MetS+ mostró unos menores niveles de HDLc comparado con los otros dos grupos, datos significativos con respecto a ambos grupos.

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes con obesidad mórbida después de la cirugía (12 meses) agrupados según la presencia de síndrome metabólico.

VARIABLES	MetS-/MetS-	MetS+/MetS-	MetS+/MetS+
Número (n/% sobre el total de pacientes)	23 (37,10)	27 (43,55)	12 (19,35)
IMC [peso (kg)/[altura (m)] ²]	33.9 ±5.5 ^{***}	32.9 ±7.5 ^{***}	40.2 ±8.2 ^{***†}
Circunferencia de la cintura (cm)	105.4 ±13.0 ^{***}	99.1 ±13.7 ^{***}	115.1 ±12.8 ^{***†§}
Circunferencia de la cadera (cm)	121.2 ±14.7 ^{***}	112.8 ±16.8 ^{***}	128.5 ±16.6 ^{***§}
Tensión arterial sistólica (mm/Hg)	119.0 ±13.2	121.3 ±13.8	133.4 ±16.8 [§]
Tensión arterial diastólica (mm/Hg)	69.5 ±8.1	70.7 ±9.6 ^{***}	74.8 ±11.4
Frecuencia cardiaca (lpm)	69.8 ±11.1 ^{***}	71.3 ±10.2 [*]	75.7 ±13.2
Diabetes mellitus (%)	4.34	0 ^{**}	36.6 ^{††§§}
Uso hipoglicemiantes (%)	0	0	27.27 ^{††§§}
Hipertensión arterial (%)	4.34	26.92 ^{††}	63.63 ^{†††§}
Uso IECAs o ARB (%)	0	15.38 ^{††}	54.54 ^{†††§§}
Colesterol total(mg/dL)	175.6 ±31.0	188.1 ±36.6 [*]	192.5 ±28.6
LDLc (mg/dL)	100.6 ±29.0 ^{**}	114.9 ±37.6 [*]	125.4 ±35.6
HDLc (mg/dL)	62.4 ±9.2 ^{**}	60.5 ±11.1 ^{***}	49.4 ±11.2 ^{†§}
Triglicéridos (mg/dL)	64.6 ±14.9 ^{***}	81.6 ±27.1 ^{***}	94.3 ±24.1 ^{†§}

Abreviaturas: MetS-/MetS-: pacientes sin síndrome metabólico que seguían sin síndrome metabólico; MetS+/MetS-: pacientes con síndrome metabólico que dejaron de tener síndrome metabólico; MetS+/MetS+: pacientes con síndrome metabólico que continuaban con síndrome metabólico; cm: centímetro; mm/Hg: milímetro de mercurio; lpm: latidos por minutos; IECAs: inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina; ARB: bloqueadores de los receptores de la angiotensina II; mg: miligramos; dL: decilitros.

Los datos están expresados como medias ± desviación estándar (SD).

Comparación **con datos obtenidos previos a la cirugía bariátrica** (test dos colas ANOVA) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Comparación *Post-hoc* vs MetS-/MetS- † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$.

Comparación *Post-hoc* vs MetS+/MetS- § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$

En resumen, podemos afirmar que la cirugía bariátrica mejoró de forma significativa muchos parámetros clínicos y metabólicos de los pacientes pero de forma llamativa, existe un grupo de pacientes que a pesar de una importante pérdida de peso, no experimentan una mejora sustancial en estos parámetros clínicos y metabólicos.

6.2.4. Medida de la PORH por láser Doppler en pacientes con obesidad mórbida al año de la cirugía bariátrica

Se realizó de nuevo la medida de la PORH por flujometría por láser Doppler al año tras la cirugía siguiendo los mismos procedimientos y pasos que la primera vez. En la tabla 12 se recogen los datos analizados.

Observamos un aumento significativo en el AUC_H en los dos grupos de pacientes sin síndrome metabólico, los grupos MetS-/MetS- y MetS+/MetS-. Sin embargo, la AUC_H no cambió significativamente en los pacientes MetS+/MetS+ ($p=0,72$).

Tabla 12. Resultados AUC_H antes y tras 12 meses de la cirugía bariátrica.

	MetS-/MetS-	MetS+/MetS-	MetS+/MetS+
Número (n/%)	23 (37,10)	27 (43,55)	12 (19,35)
AUC_H previo a la cirugía bariátrica	759,2 \pm 308,3	823,9 \pm 298,6	725,9 \pm 351,9
AUC_H post cirugía bariátrica	1306,4 \pm 761,7***	1031 \pm 306,4**	783,1 \pm 207,7

Los datos están expresados como medias \pm desviación estándar (SD).

Comparación con datos obtenidos previos a la cirugía bariátrica (test de dos colas ANOVA):

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

En la figura 27, se representan los valores de AUC_H significativos previos a la cirugía y a los 12 meses de la intervención al compararlos entre los tres grupos.

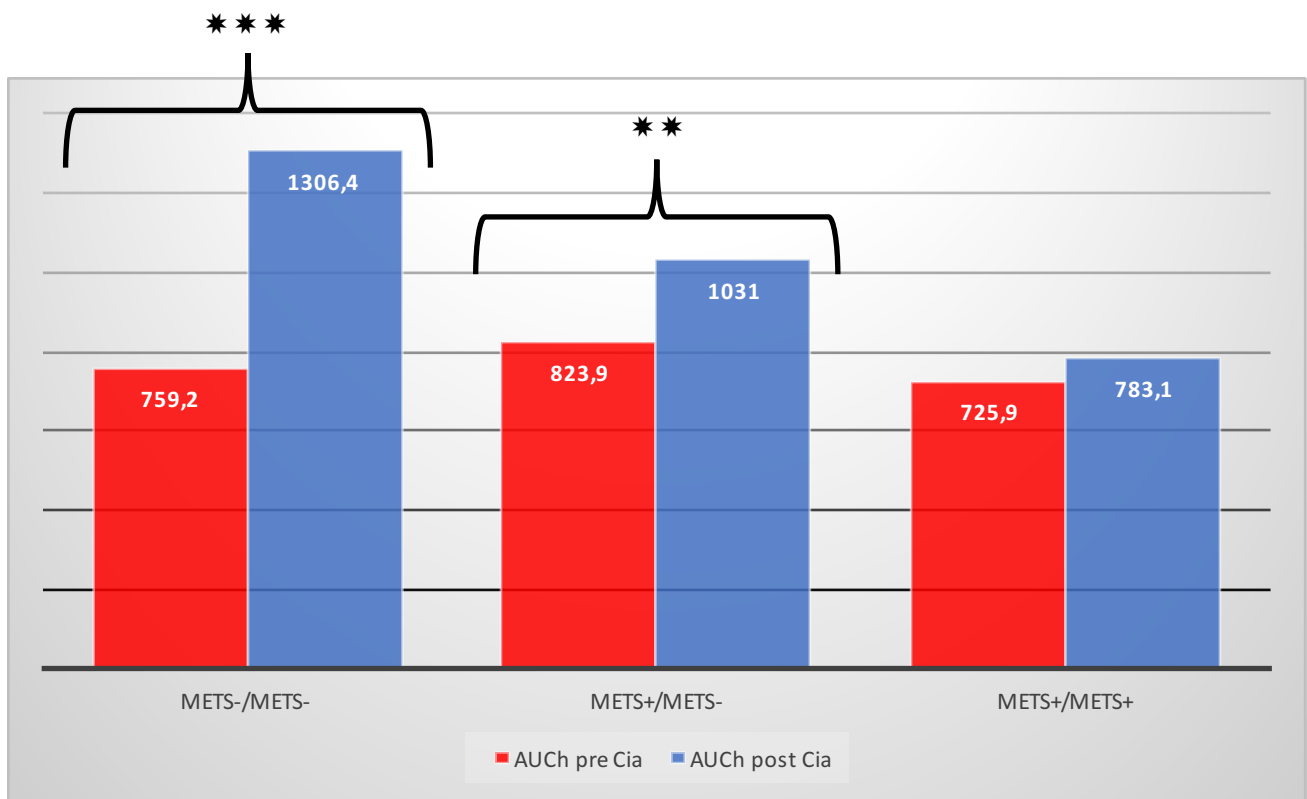


Figura 27. Valores de AUC_H de flujometrías por láser Doppler realizadas previa a la cirugía bariátrica y a los 12 meses de la misma.
Comparación con datos obtenidos previos a la cirugía bariátrica (test dos colas ANOVA) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Estos resultados indican que la mejora de la función microvascular mediada por cirugía bariátrica está claramente determinada por la presencia de síndrome metabólico.

6.3. Función microvascular en pacientes obesos con disfunción endocrina

6.3.1. Características clínicas de la cohorte de pacientes con síndrome de Cushing curados

Los pacientes con síndrome de Cushing curados, se caracterizan entre otros síntomas por tener sobrepeso. Estudios previos (y corroborados por los datos mostrados en el apartado anterior) indican una relación negativa entre obesidad y función microvascular. Por tanto, para este estudio se decidió añadir un grupo control de sujetos sanos con sobrepeso, que nos permitiera distinguir el efecto de la obesidad frente a los efectos de haber padecido

hipercortisolismo u otras morbilidades asociadas al Cushing sobre la función microvascular.

Además, se tuvo en cuenta la proporción de sexo, similar a la descrita según la prevalencia de pacientes con síndrome Cushing, donde la prevalencia de mujeres es mucho mayor que en los hombres, según la bibliografía, de 3-8 veces más frecuentes en mujeres (Giraldi F.P. et al. 2003).

Por tanto, en esta parte del trabajo se utilizaron y se analizaron tres grupos de sujetos: el grupo de sujetos sanos que sirvió de referencia para la parte de los pacientes con obesidad mórbida y que presentaban un valor normopeso (grupo sanos delgados $n= 30$) un grupo de sujetos sanos con sobrepeso (IMC 25-35 kg/m^2) (grupo sanos con sobrepeso, $n= 23$) y el grupo de pacientes de Cushing curados con una $n=51$.

Las características clínicas de estos tres grupos se muestran en la tabla 12. De los pacientes con síndrome de Cushing, la gran mayoría, 43 casos (84,3%) se debían a un adenoma hipofisario, 6 casos (11,8%) se debían a un adenoma adrenal y 2 casos (3,9 %) eran de origen ectópico (no se pudo determinar la localización). Estos porcentajes están en consonancia con las frecuencias generalmente descritas (Lacroix A. et al. 2015).

Respecto a las comorbilidades comúnmente asociadas al síndrome de Cushing y que tienen potencialmente relevancia sobre la función microvascular, observamos una prevalencia en nuestra cohorte de diabetes del 25,5% y de hipertensión del 33,33%, porcentajes también en consonancia con lo descrito en la literatura (Lacroix A. et al. 2015).

Cuando se analizaron los datos entre el grupo sano con sobrepeso y grupo de pacientes con síndrome de Cushing curados, cuyos datos se recogen en la tabla 13, se observó que eran dos grupos clínicamente muy parecidos entre ellos por lo que podíamos tener controlado el posible efecto de la obesidad y el sexo en la función microvascular en pacientes con síndrome de Cushing. De hecho, el IMC del grupo de sujetos sanos con sobrepeso era ligeramente superior al grupo de pacientes con síndrome de Cushing curados.

Como era de esperar, tanto el grupo de sujetos sanos con sobrepeso como el grupo de pacientes con síndrome de Cushing curados, mostraron unas mayores medidas de las distintas variables antropométricas.

Tabla 13. Características clínicas-metabólicas de los tres grupos estudiados

VARIABLES	GRUPO SANOS DELGADOS	GRUPO SANOS SOBREPESO	GRUPO CUSHING CURADOS	VALOR p ^a
Número	30	23	51	n/a
Mujer (n/%)	22 (73,36)	22 (95,7)***	46 (90,2)†††	< 0,001
Edad (años)	37 ± 11	46,91 ± 7,85***	43,24 ± 13,07†††	< 0,001
IMC (Kg/m ²)	24,8 ± 5	31,06 ± 2,33***	28,58 ± 5,66†††§§	< 0,001
Cintura (cm)	80,4 ± 11	99,39 ± 12,71***	92,50 ± 16,07†††	< 0,001
Colesterol HDL (mg/dL)	55,6 ± 10,07	58,28 ± 15,03	52,20 ± 12,37	0,89
Triglicéridos (mg/dL)	68,90 ± 23,40	98,28 ± 50,76	113,31 ± 67,01†††	0,03
Diabetes (n/%)	0	0	13 (25,5)†††§§§	< 0,001
Hipertensión arterial (n/%)	0	0	17 (33,33)††† §§§	< 0,001

^a ANOVA o test de Kruskal-Wallis para comparaciones entre grupos.

Los datos están expresados como medias ± desviación estándar (SD)

Comparación *Post-hoc* sanos con sobrepeso vs sanos delgados. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$;

Comparación *Post-hoc* Cushing curados vs sanos delgados. ††† $p < 0.001$;

Comparación *Post-hoc* Cushing curados vs sanos con sobrepeso §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$

6.3.2. Medida de la PORH por láser Doppler en pacientes con síndrome de Cushing curados

En la tabla 14 se muestran los resultados de las cuatro principales variables de la flujometría por láser Doppler: PORH_{PEAK}, PORH_{MAX}, AUC_O y AUC_H comparando pacientes con síndrome Cushing frente a sanos con sobrepeso y sanos delgados.

Al comparar los tres grupos, encontramos diferencias significativas en PORH_{MAX} ($p = 0,039$) y AUC_H ($p = 0,020$). Las comparaciones entre grupos revelaron que las diferencias se debía exclusivamente a las diferencias entre el grupo de Cushing curados y el grupo de sanos delgados. Dicho de otra forma, no observamos diferencias significativas en los parámetros de flujometría por láser Doppler entre pacientes con síndrome de Cushing curados y el grupo de controles con sobrepeso.

Estos resultados sugerían que los pacientes con síndrome de Cushing curados podían tener la función microvascular alterada pero que esto podía deberse eminentemente a la presencia de sobrepeso. De hecho, observamos que la AUC_H del grupo de sujetos sanos con sobrepeso era significativamente menor comparado con el grupo de sujetos sanos delgados reafirmando que la obesidad *per se* afecta negativamente a la función microvascular

Tabla 14. Variables PORH por láser Doppler en los tres grupos

VARIABLES	GRUPO SANOS DELGADOS	GRUPO SANOS SOBREPESO	GRUPO CUSHING CURADOS	VALOR p^a
$PORH_{PEAK}$	$42,5 \pm 13$	$38,63 \pm 15,52$	$38,81 \pm 19,46^\dagger$	0,117
$PORH_{MAX}$	$35,00 \pm 12$	$29,78 \pm 14,77^*$	$29,96 \pm 17,48^\dagger$	0,039
AUC_O	$1124,80 \pm 462$	$1243,53 \pm 528,98$	$1275,53 \pm 899,62$	0,732
AUC_H	$1041,50 \pm 455$	$832,63 \pm 400,59^*$	$923,49 \pm 781,67^\dagger$	0,020

^a ANOVA o test de Kruskal-Wallis para comparaciones entre grupos. * $p < 0.05$; comparación *Post-hoc* sanos con sobrepeso vs sanos delgados. $^\dagger p < 0.05$; comparación *Post-hoc* Cushing curados vs sanos delgados.

Se representan las variables significativas en gráficas para mayor apreciación de los datos en las figuras 28 y 29 respectivamente con las variables $PORH_{MAX}$ y AUC_H .

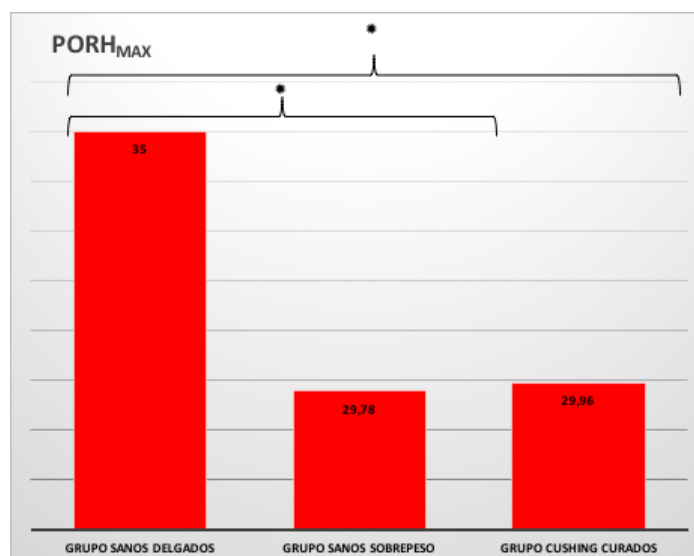


Figura 28. Representación de $PORH_{MAX}$ entre los tres grupos.

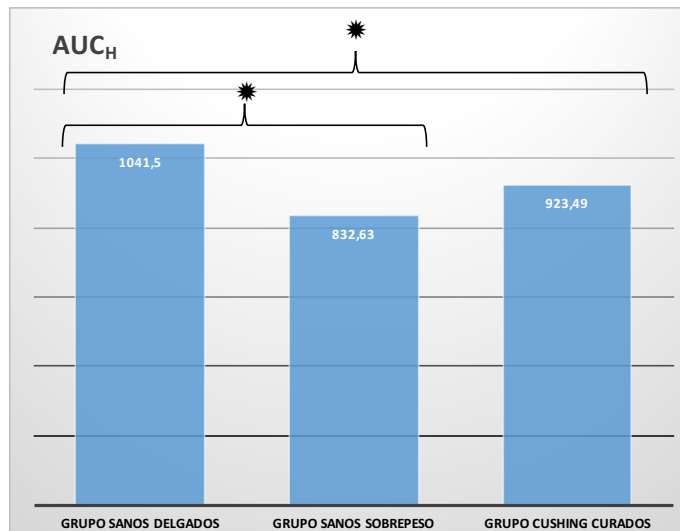


Figura 29. Representación de $PORH_{MAX}$ entre los tres grupos.

6.3.3. Asociación entre comorbilidades y disfunción microvascular en pacientes con síndrome de Cushing curados.

La falta de diferencia en los resultados de flujometría por láser Doppler entre sujetos sanos con sobrepeso y pacientes con síndrome de Cushing curados, a priori, parecía sorprendente teniendo en cuenta la gran presencia en pacientes con síndrome de Cushing curados, comorbilidades habitualmente asociadas a la disfunción vascular como son la hipertensión arterial y la diabetes mellitus.

Por ello, quisimos analizar con más detalle los datos de flujometría por láser Doppler en los pacientes con síndrome de Cushing curados, comparando grupos de pacientes Cushing curados que presentaban o no hipertensión arterial (HTA) y diabetes mellitus y a su vez, con el grupo control de sujetos sanos con sobrepeso. Estos datos, se representan en la tabla 15.

Este análisis reveló que los pacientes con síndrome de Cushing curados con HTA, mostraban una disminución de los valores $PORH_{MAX}$ y AUC_H comparados con los pacientes con síndrome de Cushing curados sin HTA y con el grupo de controles sanos con sobrepeso. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en estos parámetros entre los pacientes con síndrome de Cushing curados sin HTA y los sujetos sanos con sobrepeso.

Vistas estas diferencias, quisimos determinar si entre los grupos de pacientes con síndrome de Cushing curados con y sin hipertensión, mostraban alguna que otra diferencia en sus variables clínicas. Como se muestra en la tabla 27, no hubo grandes diferencias.

El grupo de Cushing curados con HTA mostraba una mayor edad y un mayor aumento en el IMC comparado con los pacientes con síndrome de Cushing curados sin HTA pero no comparado con los sujetos sanos con sobrepeso.

Tabla 15. Variables clínicas y función microvascular en pacientes síndrome de Cushing curados con hipertensión arterial (HTA)

VARIABLES	Sanos sobrepeso	NO HTA (n=34)	HTA (n= 17)	p ^a
Mujer (n/%)	22 (95,7)	2 (5,88)	15 (88,23)	n/a
Edad (años)	46,91 ± 7,85	38,29 ± 10,84***	53,12 ± 11,65	< 0,001
IMC (Kg/m ²)	31,06 ± 2,33	27,61 ± 5,73***	30,52 ± 5,13	< 0,001
Cintura (cm)	99,39 ± 12,71	90,27 ± 15,95*	96,82 ± 15,87	0,04
Colesterol HDL	58,28 ± 15,03	57,06 ± 13,63	51,70 ± 8,90	0,52
Triglicéridos	98,28 ± 50,76	107,55 ± 55,35	124,82 ± 86,61	0,59
PORH _{MAX}	29,78 ± 14,77	33,49 ± 16,70	22,91 ± 17,35 ^{†§§}	0,005
AUC _H	832,63 ± 400,59	1058 ± 865,96	652,89 ± 496,03 ^{†§§}	0,007

^a ANOVA o test de Kruskal-Wallis para comparaciones entre grupos.

Los datos están expresados como medias ± desviación estándar (SD).

Comparación *Post-hoc* pacientes con síndrome de Cushing curados sin HTA vs sanos sobrepesos* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$;

Comparación *Post-hoc* pacientes Cushing con HTA vs sanos sobrepesos † $p < 0.05$

Comparación *Post-hoc* pacientes síndrome de Cushing curados con HTA vs Cushing sin HTA § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$.

Abreviaciones. HTA: hipertensión arterial; IMC: Índice de masa corporal.

Realizamos un análisis similar agrupando los pacientes con síndrome de Cushing curados, según la presencia o no de diabetes mellitus, una variable también que potencialmente puede afectar a la disfunción microvascular. Sin embargo, en este caso no observamos diferencias significativas en PORH_{MAX} y AUC_H entre estos dos grupos de pacientes con síndrome de Cushing curados.

Por tanto, estos resultados apuntaban a que la presencia de la hipertensión podía ser una de las principales causas de disfunción microvascular en pacientes con síndrome de Cushing curados.

7.DISCUSIÓN

7. Discusión

7.1. Reproducibilidad de la técnica flujometría por láser Doppler

Para evaluar la función microvascular utilizamos la hiperemia reactiva post oclusión (PORH) en la superficie de la piel analizada por flujometría por láser Doppler, un método ampliamente utilizado en investigación vascular (Roustit M. et al. 2012). La PORH ha demostrado ser altamente reproducible en sujetos sanos y sujetos con alguna patología (Tibirica E. et al. 2011; Yvonne-Tee G.B. et al. 2005; Agarwal SC. et al. 2010). Sin embargo en pacientes con obesidad mórbida la reproducibilidad de la técnica no está fehacientemente demostrada.

Los resultados de reproducibilidad en pacientes con obesidad mórbida se consideraron muy buenos según el análisis de los datos en función de la fuerza de concordancia intraclase y la representación gráfica de Bland & Altman, dos métodos estadísticos totalmente independientes y ampliamente utilizados en análisis de reproducibilidad. La metodología exhaustiva utilizada para realizar la técnica de flujometría por láser Doppler fue fundamental para evitar posibles sesgos y poder alcanzar estos resultados.

En pacientes previos a la cirugía bariátrica, de las cuatro variables elegidas para estudiar la función microvascular ($PORH_{PEAK}$, $PORH_{MAX}$, AUC_O y AUC_H), el coeficiente de correlación intraclase fue bueno, en una escala medida mediante fuerza de concordancia que varía del: muy bueno, bueno, moderada, mediocre o mala/nula.

De la misma forma estas mismas medidas de reproducibilidad, realizadas en las mismas condiciones al año tras cirugía los resultados mejoraban sustancialmente y exceptuando el AUC_O , que mostraba un coeficiente de correlación intraclase bueno, el resto de variables mostraban una fuerza de concordancia de muy buena, validando por tanto, el uso de esta técnica en pacientes con obesidad mórbida.

Por otro lado, estudiando la reproducibilidad de manera gráfica mediante el método de Bland & Altman en pacientes antes de la cirugía bariátrica, todas las variables de flujimetría analizadas presentaban unos valores muy aceptables y dentro de los límites establecidos como normalidad ($SD \pm 1,96$).

Al año tras cirugía, al igual que pasaba con el coeficiente de correlación intraclase, los resultados de reproducibilidad mejoraban. El valor de AUC_H , era el que peor se representaba, aunque solamente fueron 5 casos fuera de los límites establecidos, ocurrió igual que en el análisis previo a la intervención quirúrgica, y los valores de reproducibilidad mejoraron al año.

Esta mejoría de los resultados, está en concordancia con la reproducibilidad estudiada en sujetos sanos no obesos, donde la técnica de láser Doppler está muy estudiada y validada.

Por tanto nuestros análisis de reproducibilidad en pacientes con obesidad mórbida amplían los resultados y los estudios realizados hasta la fecha y demuestran que los parámetros más relevantes de flujometría por láser Doppler, son reproducibles con valores similares a los estudios publicados de reproducibilidad en sujetos sanos no obesos (Roustit M. et al. 2010).

Por tanto, para el resto del trabajo se realizó la flujometría por láser Doppler en las mismas condiciones que en las analizadas para la reproducibilidad, y además se insistió en la necesidad de mantener las mismas condiciones ambientales y de dinámica de trabajo en todo momento. Estas condiciones estaban relacionadas con el control de temperatura de la habitación, posición del paciente en la cama, colocación del sensor láser y registro constante de las Unidades de Perfusión evitando los artefactos que podían aparecer por el uso y colocación indebida de las líneas que conectaban el sensor láser con el aparato de flujometría por láser Doppler.

Quisimos también que los pacientes siguieran las instrucciones y consejos en relación al período de ayuna, la eliminación de hábitos tóxicos tales como el tabaco o el café, o que realizaran un período de reposo previo al inicio de la técnica o el día anterior, para mantener unos criterios unificados previos a la realización de la técnica, y por ello, se insistió y se hizo especial hincapié en estos aspectos cuando se citaban a los pacientes y se les proporcionaba estas instrucciones.

La realización de la técnica en las mismas condiciones, la insistencia en que los pacientes entendieran la importancia de llevar a cabo las instrucciones dadas, y que la flujometría por láser Doppler fuera realizada por la misma persona son condiciones que para la reproducibilidad de la técnica consideramos muy importantes y quizás por ello, los resultados obtenidos en el análisis de los datos está muy relacionado con ello. Por eso, durante el transcurso de la recogida de datos, se intentó seguir con exactitud paso por paso estos procedimientos.

7.2. Función microvascular en pacientes con obesidad mórbida

Las personas con obesidad mórbida tienen un riesgo significativo de desarrollar complicaciones médicas tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), dislipemias, hipertensión, apnea del sueño, depresión y ciertos tipos de cáncer (Flegal KM. et al. 2012; Wyatt S.B. et al. 2006; Martins C. et al. 2011; Schauer P.R. et al. 2012; Sánchez-de-la-Torre M. et al. 2012).

Por otro lado, algunos mecanismos fisiopatológicos están posiblemente implicados en las interacciones entre la obesidad, alteraciones cardiovasculares e hipertensión, incluyendo una activación del sistema nervioso simpático, del sistema renina-angiotensina, resistencia insulínica, aumento de los niveles de leptinas, sistema inflamatorio, disfunción endotelial y estrés oxidativo (Grassi G. et al. 2009).

La cirugía bariátrica es sin lugar a dudas, el tratamiento más efectivo para la obesidad mórbida en la actualidad, aunque los recursos económicos necesarios superan la capacidad efectiva de ofrecer estas intervenciones quirúrgicas a un gran porcentaje de los afectados. La comprensión de los mecanismos que desencadenan los potentes efectos de la cirugía bariátrica sobre el metabolismo sistémico conducirá a nuevos objetivos para el desarrollo de terapias para la obesidad y enfermedades metabólicas (Frikke-S. et al. 2016).

En numerosos trabajos publicados (Laimer M. et al. 2002; Williams I.L. et al. 2005; Stacy A. et al. 2011; Sjostrom L. et al. 2007; Sturm W. et al. 2009; Lind L. et al. 2009; Habib P. et al. 2009), se concluye que después de la cirugía bariátrica aparecen un gran número de cambios a nivel sistémico en relación con la pérdida de peso. Estos cambios implican

reducción de la glucosa en ayunas, colesterol sérico y triglicéridos; aunque no está del todo claro hasta donde se extienden estos cambios, que por sí mismo, contribuyen a las diferencias observadas en la resistencia estructural arterial y funcional (Ciuceis C. et al. 2011).

En nuestro estudio, un 63% de los sujetos con obesidad mórbida antes de la cirugía presentaban el síndrome metabólico.

Comparando las características clínicas el grupo control de sujetos sanos, y los dos grupos de pacientes con obesidad mórbida (Ob/MetS+ y Ob/MetS-), éstas presentaban diferencias significativas.

Sin embargo, al comparar los dos grupos según la presencia de síndrome metabólico o no, éstos también fueron significativos, revelando una asociación entre los pacientes con síndrome metabólico y los que no. En cualquier caso las variables clínicas de los pacientes con obesidad mórbida presentaban peores resultados que los del grupo control.

La flujometría por láser Doppler puede dar numerosos parámetros y variables. El AUC_H es uno de los parámetros más utilizados porque mide simultáneamente la velocidad, intensidad y duración de la respuesta a la hiperemia (Roustit M. et al. 2012). Muchos estudios han demostrado que el AUC_H es el indicador más fiable de la disfunción microvascular en pacientes con alto riesgo cardiovascular (Stiefel P. et al. 2012; Kruger A. et al. 2006; Yamamoto R. et al. 2009; Rossi M. et al. 2011) y al analizar las variables relacionadas con la función microvascular en nuestro trabajo, la única que presentaba diferencias significativas entre los tres grupos fue la AUC_H , parámetro importante por lo que aporta al estudio de la función microvascular. Nuestros estudios de flujometría por láser Doppler realizados antes de la cirugía bariátrica revelaron que el AUC_H fue significativamente menor en los pacientes con obesidad mórbida cuando se comparó con el grupo de control sujetos sanos.

Sin olvidarnos de que el AUC_H , es el área de hiperemia resultante, y la respuesta vascular que surge cuando se libera el aire del esfigmomanómetro del paciente, que este parámetro estuviera alterado en los dos grupos de obesos mórbidos y que hubiera

diferencias significativas tanto con el grupo control como entre ellos dos, indica que la obesidad mórbida puede afectar a la función microvascular de los pacientes y que la presencia de comorbilidades asociadas al síndrome metabólico, puede incluso empeorar estos resultados.

La obesidad mórbida por sí sola, es un factor influyente en la modificación de la función microvascular, que junto a la resistencia insulínica están frecuentemente asociadas a otros factores de riesgos cardiovasculares como la diabetes mellitus tipo 2, hipertensión dislipemia y alteración de la coagulación/fibrinólisis, todos componentes del síndrome metabólico (Reaven GM. 1993; Boillot A. et al. 2013). En combinación, todas las anormalidades anteriores crean un estado constante y progresivo de daño a la pared vascular manifestada por un proceso progresivo inflamatorio y disfunción endotelial (Caballero E. 2003).

Nuestros datos han revelado una asociación entre los pacientes con síndrome metabólico y la mejoría de la disfunción microvascular en pacientes obesos tras cirugía bariátrica. De hecho, la evidencia clínica y experimental sugiere que la disfunción microvascular puede jugar un papel crucial en el desarrollo de la hipertensión y resistencia insulínica asociada a la obesidad (De Boer MP. et al. 2012; Levy B.I. et al. 2008; Serne E.H. et al. 2007).

La cirugía bariátrica indujo una pérdida de peso significativa al año, reflejada en la mejora significativa de la función microvascular en pacientes obesos sin síndrome metabólico (Ob/MetS-), incluyendo a los pacientes que presentaban síndrome metabólico antes de la cirugía, tal y cómo se presentan los datos en la tabla 11.

Estos resultados están en consonancia con estudios previos que demuestran que la disfunción microvascular puede revertirse en los pacientes obesos después de una cirugía bariátrica exitosa (Rossi M, et al. 2011; Lind L. et al. 2009; Williams I.L. et al. 2005; Brethauer S.A. et al. 2011; Gokce N. et al. 2005).

Los resultados de la cirugía bariátrica en las variables clínicas, se ve muy reflejado especialmente en dos grupos de pacientes, el grupo de MetS-/MetS- y el MetS+/MetS- que presentaron mejoras significativas en casi todas las variables clínicas, lo que indicaba la importancia de pérdida de peso y la no presencia de síndrome metabólico para mejorar las variables analizadas. El grupo que aún presentaba síndrome metabólico después de la intervención (MetS+/MetS+), y a pesar de la importante pérdida de peso, en general no mejoró a nivel clínico salvo las medidas antropométricas.

En relación a las variables de la flujometría por láser Doppler, al igual que en las variables clínicas, hubo una mejora del AUC_H en los dos grupos que no presentaban síndrome metabólico (MetS-/MetS- y MetS+/MetS-) a los 12 meses de la cirugía bariátrica. Sin embargo en el grupo con síndrome metabólico, este parámetro microvascular no mejoraba.

Por tanto, el síndrome metabólico es un potente determinante de la función microvascular asociada a la pérdida de peso por cirugía bariátrica, conclusión extraída también en artículos de reciente publicación que destacan la importancia de tener en cuenta la presencia del síndrome metabólico en los pacientes que se van a intervenir de cirugía bariátrica de manera protocolizada (Koprovski R. et al. 2017; Colquitt J.L. et al. 2014).

Queda por determinar para el futuro que componente o componentes del síndrome metabólico son más determinantes en la falta de mejora de la función microvascular asociada a la pérdida de peso tras cirugía bariátrica.

7.3. Función microvascular en pacientes con síndrome de Cushing curados

La ganancia de peso es uno de los principales signos clínicos en pacientes con síndrome de Cushing ya que según los trabajos publicados, hasta un 82% de los pacientes la presentan (Valassi E. et al. 2011). La distribución central de la grasa, la plétora facial y la acumulación de grasa en el área dorso cervical (jiba de búfalo) son características propias pero con una relativa baja especificidad. El prototipo de paciente con síndrome de Cushing

podría caracterizarse por: mujer y acumulación de tejido adiposo a nivel visceral y troncal (Geer E.B. et al. 2010).

Las enfermedades cardiovasculares representan la principal complicación y causa de muerte en los pacientes con síndrome de Cushing (Feelders R.A. et al. 2012) a causa de las complicaciones clínicas sistémicas del hipercortisolismo, el cual incluye la obesidad, déficit de tolerancia a la glucosa o diabetes mellitus, dislipemia e hipertensión arterial sistémica, elementos constituyentes también del síndrome metabólico (Mancini T. et al. 2004; Pivonello R. et al. 2005).

La corrección del hipercortisolismo en el síndrome de Cushing no lleva necesariamente a una remisión de la anomalías clínicas asociadas con esta condición. Hay estudios (Martínez M.A. et al. 2009) que sugieren que el aumento del riesgo cardiovascular en los pacientes con síndrome de Cushing curados persiste incluso hasta 5 años después de la resolución de la enfermedad debido al mantenimiento de algunas de las características típicas de hipercortisolismo crónico. Esto parece ser debido a la relación entre el mantenimiento de la obesidad central y la alteración de secreción de los adipocitos los cuales mantienen características del síndrome metabólico incluyendo la dificultad a tolerancia de la glucosa, hipertensión, dislipemia, aterosclerosis e hipercoagulabilidad (Valassi E. et al. 2012).

Dado que los pacientes con síndrome de Cushing curados muestran sobrepeso, y la obesidad por sí misma puede ser causa de disfunción microvascular, en nuestro estudio incluimos un grupo control con características similares anatomofisiológicas a los pacientes con síndrome de Cushing curados. Esto nos permitiría determinar, caso de existir disfunción microvascular en pacientes con síndrome de Cushing curados, si ésta se debía a la obesidad exclusivamente o a otras comorbilidades.

Los resultados de la flujimetría por láser Doppler mostraron que los pacientes con síndrome de Cushing curados mostraban una menor función microvascular con el grupo de pacientes sanos delgados pero no con el grupo de pacientes sanos con sobrepeso. Esto indicaba que la función microvascular en pacientes con síndrome de Cushing curados estaba

alterada por la presencia de sobrepeso. La falta de diferencia en la función microvascular entre pacientes sin síndrome de Cushing curados y sujetos sanos con sobrepeso fue de alguna manera sorprendente, teniendo en cuenta la presencia de comorbilidades como la hipertensión y la diabetes mellitus en pacientes con síndrome de Cushing curados, comorbilidades habitualmente asociadas a la disfunción microvascular.

Un análisis más pormenorizado de los resultados de la función microvascular en los pacientes de Cushing curados reveló que aquellos pacientes con hipertensión arterial mostraban una peor función microvascular cuando se comparaban frente a los pacientes con síndrome de Cushing curados sin hipertensión arterial así como al grupo control sano con sobrepeso. Es decir, que tanto la obesidad como la hipertensión son comorbilidades del síndrome de Cushing que afectan a la función microvascular. Por tanto, nuestros resultados indican una asociación entre obesidad, hipertensión y disfunción microvascular, como se ha descrito en otros tipos de patologías (Oana S. et al. 2017; Kang Y.S. 2013; Resmini E. 2014).

Por otra parte, nuestro estudio incide en la noción de que los pacientes con síndrome de Cushing tienen un alto riesgo cardiovascular como se ha descrito previamente utilizando otras técnicas no invasivas diferentes a la utilizada en nuestro trabajo, como la tomografía cardíaca (Barahona M. J. et al. 2013; Clayton R.N. et al. 2011).

Nuestro estudio también coincide con otros trabajos publicados en que a pesar la resolución de la situación de hipercortisolismo en los pacientes con síndrome de Cushing, las comorbilidades de base pueden persistir (Resmini E. 2014). No hay una explicación clara sobre la persistencia de la morbilidad “residual” en los pacientes con síndrome de Cushing curados (Resmini E. 2014). Parece razonable pensar que el daño a largo plazo de órganos específicos causado por el hipercortisolismo persistirá dependiendo de la posibilidad de capacidad de recuperación de cada tejido y de la duración de la enfermedad. En todas las revisiones actuales sobre síndrome Cushing se apunta que es una de las áreas que requiere más estudio, no sólo para avanzar en las posibles bases fisiopatológicas sino por el impacto tan crítico sobre la salud del paciente. En este sentido, nuestros resultados de este estudio inciden en la falta de mejoría de la función microvascular tras la cura de la enfermedad.

8. CONCLUSIONES

8. Conclusiones

- La técnica de flujometría por láser Doppler es reproducible en pacientes con obesidad mórbida.
- Los pacientes con obesidad mórbida muestran una disminución de la función microvascular medida por flujometría por láser Doppler comparado con sujetos sanos no obesos.
- La cirugía bariátrica mejora las variables clínicas y metabólicas asociadas a la obesidad mórbida al año de la cirugía.
- La cirugía bariátrica mejora la función microvascular medida por flujometría por láser Doppler en pacientes con obesidad mórbida al año de la cirugía, salvo en aquellos pacientes en los que se mantiene el síndrome metabólico.
- Los pacientes con síndrome de Cushing curados muestran una disminución de la función microvascular medida por flujometría por láser Doppler comparado con sujetos sanos no obesos pero no con sujetos sanos con un sobrepeso similar al observado en pacientes con síndrome de Cushing.
- Los pacientes con síndrome de Cushing curados con hipertensión muestran una disminución de la función microvascular comparados con pacientes con síndrome de Cushing curados sin hipertensión.

9. BIBLIOGRAFÍA

AGARWAL S.C., ALLEN J., MURRAY A., et al. (2010). Comparative reproducibility of dermal microvascular blood flow changes in response to acetylcholine iontophoresis, hyperthermia and reactive hyperaemia. *Physiol Meas*. Vol. 31: 1-11.

AKAZA I., YOSHIMOTO T., TSUCHIYA K. et al. (2010). Endothelial dysfunction associated with hypercortisolism in reversible Cushing's syndrome. *Endocrine Journal*. Vol. 57: 245-252.

ALBINGER N., TESTE R.M., ALMOTO B. et al. (2006). Patients with Cushing's syndrome have increased intimal media thickness at different vascular levels: comparison with a population matched for similar cardiovascular risk factors. *Hormone and Metabolic Research*. 38: 405-410.

ANDERSON T.J., GEHARD M.D., MEREDITH IT. et al. (1995). Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. Feb; 75 (6): 71B-74B.

ARANCETA-BARTRINA J., SERRA-MAJEM L., FOZ-SALA M. et al. (2005). Prevalencia de obesidad en España. *Med Clin (Barc)*. Vol. 125 (12): 460-6.

ARREBOLA-MORENO A., RECIO-MAYORAL A., KASKI C. (2011). Papel de la microcirculación coronaria en las enfermedades cardíacas. *Cardiocare*. Vol. 46(4): 161-166.

ARREBOLA-MORENO A.L. (2012). Evaluación no invasiva de la función endotelial en la práctica clínica. *Rev. Esp. Cardiol*. 65 (1): 80-90.

BARAHONA, J.M^a., RESMINI E., VILADE'S D. et al. (2013). Coronary Artery Disease detected by Multislice Computed Tomography in patients after long-term cure of Cushing's syndrome. *Clin. Endocrinol. Metab*. Vol. 98: 1093-1099.

BAYKAN M., EREM C., GEDIKLI O. et al. (2007). Impairment of flow-mediated vasodilatation of brachial artery in patients with Cushing's syndrome. *Endocrine*. Vol. 31: 300-304.

BIRCHER A. (1994). Guidelines for measurement of cutaneous blood flow by laser doppler flowmetry. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*. 30: 65-72.

BLAND J.M, ALTMAN D.G. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. Vol. 12: 307-310.

BLAND J.M, ALTMAN D.G. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res*. Vol. 8:135-60.

BOIGNARD A., et al. 2005. Local hyperemia to heating is impaired in secondary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Res. Ther*. Vol. 7: R1103-R1112.

BOILLOT A., ZOUNGAS S., MITCHELL P., et al. (2013). Obesity and the Microvasculature: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. Vol. 8(2): 52708.

BOLLINGER A., FREY J., JAGER K. et al. (1982). Patterns of diffusion through skin capillaries in patients with long-term diabetes. *N. England J. Med*. 307: 1305-1310.

BRETHAUER S.A, HENEGHAN H.M, ELDAR S. et al. (2011). Early effects of gastric bypass on endothelial function, inflammation, and cardiovascular risk in obese patients. *Surg. Endosc*. Vol 25: 2650–2659.

BULL R.H., BATES D.O., MORTIMER P.S. (1992). Intravital video-capillaroscopy for the study of the microcirculation in psoriasis. *Br. J. Dermatol*. Vol. 126: 436-445.

CABALLERO E.(2003). Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes. Res*. Vol.11: 1278–1289.

CAMICI P.G., CREA F. (2007). Coronary microvascular dysfunction. *N. Engl. Med*. Vol. 356: 830-40.

CANNON C.P., STEINBERG B.A., MURPHY S.A., et al. (2006). Meta-analysis of cardiovascular outcomes trials comparing intensive versus moderate statin therapy. *J. AM. Coll. Cardiol*. Vol. 48: 438-45.

CELERMAYER D.S., SORENSEN K.E., GOOCH V.M. et al. (1992). Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. Vol. Nov; 340 (8828): 1111-1115.

CERNY V., TUREK Z., PARIZKOVA R. (2007). Orthogonal Polarization Spectral Imaging” *Physiol. Res*. Vol. 56: 141-147.

CÍA P., PINILLAJA., CÍA BLASCO P. et al. (1999). Fisiopatología del endotelio vascular. Curso monográfico del Doctorado de Cardiología Preventiva. Ed. Casanovas Lenguas JA, Ferreira Montero J. Zaragoza: Edika Med. Cap.3 pp. 19-30.

CLAYTON R.N., RASKAUSKIENE D., REULEN R.C. et al. (2011). Mortality and morbidity in Cushing's disease over 50 years in Stoke-on-Trent, UK: audit and meta-analysis of literatura. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. Vol. Mar. 96(3): 632-42.

COLQUITT J.L., PICKETT K., LOVEMAN E. (2014). Surgery for weight loss in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. Vol. Aug. 8(8): 231-243.

CORRETTI M.C., ANDERSON T.J., BENJAMIN E.J. et al. (2002). Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the international brachial artery reactivity task forcé. *Journal of the American College of Cardiology*. Jan. 39 (2): 257-265.

CRACOWSKI J.L., MINSON C.T., SALVAT-MELIS M. et al. (2006). Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends in Pharmacological Sciences*. Sep; 27(9): 503-508.

CHARKOUDIAN N., et al. (2003). Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it Works, when it does not, and why. *Mayo Clin*. Vol. 78: 603-612.

CHEN E.Y., BOCCHIERI-RICCIARDI L.E., MUÑOZ D. et al. (2007). Depressed mood in class III obesity predicted by weightrelated stigma. *Obes Surg*. Vol. May;17(5):669-71.

DE BOER M.P., MEIJER R.L., WIJNSTOK N.J. et al. (2012). Microvascular dysfunction: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity associated insulin resistance and hypertension. *Microcirculation*. Vol.19: 5-18.

DE CIUCEIS C., ENZO P., RIZZONI D. et al.(2011).Effects of Weight Loss on Structural and Functional Alterations of Subcutaneous Small Arteries in Obese Patients *Hypertension*. Vol.58:29-36.

DUPUIS J. 2005. Non invasive evaluation of endothelial vascular reactivity: should the quest continue?. *The Canadian Journal of Cardiology*. Vol. Oct; 21 (12): 1047-1051.

ELLS L.J., LANG R., SHIELD J.P. et al. (2007). Obesity and disability: a short review. *Obes Rev*. Nov;7(4): 341-5.

ERIKSSON S., NILSSON J., STURESSON C. (2014). Non-invasive imaging of microcirculation: a technology review. *Medical Devices: Evidence and Research*. 7: 445–452.

Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. (2001). Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). *Jama*. 285: 2486-2497.

FAGGIANO A., PIVONELLO R., SPIEZIA S. et al. (2003). Cardiovascular risk factors and common carotid artery caliber and stiffness in patients with Cushing's disease during active disease and one year after disease remission. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 88: 2527-2533.

FEELDERS R.A., PULGAR S.J., KEUPEL A. et al. (2012). The burden of Cushing's disease: clinical and health-related quality of life aspects. *European Journal of Endocrinology*. 167: 311-326.

FERRAU F., KORBONITS M. (2015). Metabolic comorbidities in Cushing's syndrome. *European Journal of Endocrinology*. Vol. 173:133-157.

FISHER B.L, SCHAUER P. (2002). Medical and surgical options in the treatment of severe obesity. *Am. J. Surg*. Vol. Dec. 184(6B):9S-16S.

FLEGAL K.M., CARROLL M.D., KIT B.K. et al.(2012. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA*. Vol. Feb 1;307(5):491-7.

FLEISS JL. 1986. Valoración de la concordancia según los valores del coeficiente de correlación intraclase (ICC). The design and analysis of clinical experiments. New York: Wiley.

FRIKKE-SCHMIDT, H., O'ROURKE R. W., LUMENG C. N. et al. (2016). Does bariatric surgery improve adipose tissue function? Obesity reviews. Vol. 17: 795–809.

GALANAKIS C.G., DASKALAKIS M., MANIOS A. et al. (2014). Computed tomography-based assessment of abdominal adiposity changes and their impact on metabolic alterations following bariatric surgery. World J. Vol. 39: 417–23.

GALLEY H. F., WEBSTER. R. (2004). Physiology of the endothelium. British Journal of Anaesthesia. Vol. 93 (1): 105-13.

Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. (1992). Am. J. Clin. Nutr. Vol. 55: 615S–619S.

GEER E.B., SHEN W., GALLAGHER D., et al. (2010). MRI assessment of lean and adipose tissue distribution in female patients with Cushing's disease. Clin. Endocrinol. Vol. 73: 469–475.

GIRALDI P., MORO M., CAVAGNINI F. (2003). Gender-related differences in the presentation and course of Cushing's disease. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Vol. 88(4): 1554-1558.

GOKCE N., VITA J.A., MCDONNELL M. et al. (2005). Effect of medical and surgical weight loss on endothelial vasomotor function in obese patients. Am. J. Cardiol. Vol. 95: 266–268.

GRASSI G., DIEZ J. (2009). Obesity-related cardiac and vascular structural alterations: beyond blood pressure overload. J. Hypertens. Vol. 27: 1750–1752.

GREGG E.W., GURALNIK J.M. (2007). Is disability obesity's price of longevity? JAMA. Nov 7;298(17): 2066-7.

GUALLAR-CASTILLÓN P., RODRÍGUEZ F., BANEGAS J.R. et al. (1999). Factores ambientales en la vida temprana y nivel socioeconómico en la actualidad: ¿cuál es más importante para la mortalidad cardiovascular en España? Med. Clin. (Barc). Vol.113:444-6.

Guía usuario. Periflux System 5000. PERIMED.

GUTIERREZ J., LARROTE G., CAMPUZANO G. (2009). Síndrome de Cushing. Medicina & laboratorio. Vol. 15: 411-430.

GUTIÉRREZ-FISAC J.L., LÓPEZ E., BANEGAS J., GRACIANI A. et al. (2004). Prevalence of overweight and obesity in elderly people in Spain. Obesity Research Vol. 12. Nº 4 April.

GUTIERREZ-FISAC J.L., GUALLAR-CASTILLON P., LEON-MUÑOZ L.M. et al. (2012). Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008-2010: The ENRICA study. Obes. Rev. Vol. Apr. 13(4):388-92.

GUYTON, C.G. and HALL, J.E. Tratado de Fisiología Médica. 13ª Edición. Elsevier, 2016.

HABIB P., SCROCCO J.D., TEREK M. et al. (2009). Effects of bariatric surgery on inflammatory, functional and structural markers of coronary atherosclerosis. Am J Cardiol Vol.104: 1251-5.

HAYDEN M.J., DIXON M.E., DIXON J.B. et al. (2010). Perceived discrimination and stigmatisation against severely obese women: Age and weight loss make a difference. Obes Facts. Vol. Feb.3(1):7-14.

HETTENA M.E., ZHANG D., STIENSTRA T., et al. (2008). Decreased capillary permeability and capillary density in patients with systemic sclerosis using large window sodium fluorescein video densitometry of the ankle. Rheumatology (Oxford). Vol. 47: 1409-1412.

INONE A., YANAGISAWA M., KIMURA S. et al. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol.86: 2863-7.

Instituto Nacional de Estadística. Marzo 2016. Defunciones según la causa de muerte 2014. Madrid: Instituto Nacional de Estadística.

Insuficiencia cardiaca crónica. (2010). Editorial Federación Argentina de Cardiología. 3ª Edición. Capítulo 6, revisado 2015. Página: 114-171.

JOANNIDE R., HAEFELI W.E., LINDER L. et al.(1995). Nitric oxide human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. Vol. 91 (5): 1314-1319.

JOHNSTON C.A., TYLER C., FOREYT J.P. (2007). Behavioral management of obesity. *Curr Atheroscler Rep*. Vol. Dec. 9(6):448-53.

JONES C.J.H., KNO L., DAVIS M.J. et al. (1996). Role of nitric oxide in coronary microvascular responses to adenosine and increased metabolic demand. *Circulation*. Vol. 91: 1807-1813.

KALIA Y.N., NAIK A., GARRISON J.et al. (2004). Iontophoretic drug delivery". *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. Mar; 56(5): 619-658.

KANG YS. (2013). Obesity associated hypertension: new insights into mechanism. *Electrolyte Blood Press*. Vol. Dec;11(2): 46-52.

KELLY J.J., MARTIN A., WHITWORD J.A. (2000). Role of erythropoietin in cortisol-induced hypertension. *Journal of human hypertension*. Vol. 14: 195-198.

KELLY R.I., PEARSE R., BULL R.H.et al. (1995). The effects of aging on the cutaneous microvasculature. *J. Am. Acad. Dermatol*. Vol. 33: 749-756.

KNOWLER W.C., BARRETT-CONNOR E., FOWLER S.E. et al. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*. Vol. Feb 7;346(6):393 403.

KOPROVSKI R., WESTON A., SCHMID H. (2017). Evaluation of Metabolic Syndrome in morbidly Obese Patients Submitted to Laparoscopic Bariatric Surgery: Comparison of the Results between Roux-En-Y Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy. *Obes Surg*. Vol. Feb 7.

KOYTE A., LEGRAND-FERNÁNDEZ M.S., ABRAHAM P. et al. (2004). Low skin temperature impairs the cutaneous vasodilator response to local progressive pressure strain. *Microvascular Research*. Vol. 67: 203-206.

KRUGER A., STEWART J., SAHITYANI R. et al. (2006). Laser Doppler flowmetry detection of endothelial dysfunction in end-stage renal disease patients: correlation with cardiovascular risk. *Kidney Int*. Vol. 70: 157–164.

KUBLI S., WAEBER B., DALLE-AVE A. et al. (2000). Reproducibility of laser Doppler imaging of skin blood flow as a tool to assess endothelial function” *J. Cardiovasc. Pharmacol*. Vol. 36; 640-648.

LACROIX A., FEELDERS R. A., STRATAKIS L. et al. (2015). Cushing’s syndrome. *Lancet* Vol. 386: 913–27.

LAIMER M., EBENBICHLER CF., KASER S. Et al. (2002). Markers of chronic inflammation and obesity: a prospective study on the reversibility of this association in middle-aged women undergoing weight loss by surgical intervention. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*. Vol. 26(5): 659–662.

LECUBE A., MONEREO S. (2011). RICIBA (computerized registry of bariatric surgery), what do we know about bariatric surgery in Spain? *Endocrinol Nutr*. Vol. Aug-Sep. 58(7):323-4.

LEÓN A., MADRAZO A., ÁLVAREZ A. et al. (2016). A probabilistic model for Cushing’s syndrome screening in at risk populations: a prospective multicenter study. *J. Clin. Endocrinology and metabolism*. Vol. Oct; 101(10): 3747-54.

LEVY B.I., SCHIFLIN E.L., MOURAD J.J. et al. (2008). Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity and diabetes mellitus. *Circulation*. Vol. 118: 968-976.

LIANG T.C.M., SU H.F., LEE N. Y. (2000). Skin temperature and skin blood flow affect bioelectric impedance study of females fat-free mass. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. Vol. 32, 221-234.

LIND L., ZETHELIUS B., SUNDBOM M., et al. (2009). Vasoreactivity is rapidly improved in obese subjects after gastric bypass surgery. *Int. J. Obes (Lond)* Vol. 33: 1390–1395.

LINDERT L., KIOWSKI W., BÜHLER F.R. et al. (1990). Indirect evidence for release of endothelium derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension.” *Circulation*. Vol. Jun. 81(6): 1762-1767.

LINDERT L. et al. (2000). OPS imaging of human circulation: a short technical report. *J. Vasc. Res*. Vol. 39: 368-372.

LOSCALZO J., WELCH G. (1995). Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog. Cardiovasc. Dis*. Vol. 38:87-104.

LUDMER P.L., SELWYN A.P., SHOOK T.L. et al. (1986). Paradoxical vasoconstriction by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *The New England Journal of Medicine*. Oct; 315 (17): 1046-1051.

MAGIAKOU M.A., SMYRNAKI P., CHROUSOS G.P. (2010). Hypertension in Cushing’s syndrome: from pathogenesis to treatment. *Neuroendocrinology*. Vol. 92 (1): 44-49.

MAJEM L.S., RIBAS L., ARANCETA J. et al. (2003). Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del estudio enKid (1998-2000). *Med. Clin. (Barc)* Vol. 121 (19): 725-32.

MANCINI T, KOLA B, MANTERO F. et al. (2004). High cardiovascular risk in patients with Cushing’s syndrome according to 1999 WHO/ISH guidelines. *Clin. Endocrinol*. Vol. 61(6): 768 –777.

MANN G.E., YUDILEVICH D.L., SOBREVIA L. (2003). Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol. Rev*. Vol. 83: 183-252.

Manual del residente de endocrinología y nutrición. Editado por Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición. SEEN 2009.

MARQUEZ-IBAÑEZ B., ARMENDARIZ-ANGUIANO A.L., BACARDI-GASCON M.et al.(2008). Review of controled clinical trials of behavioral treatment for obesity. Nutr. Hosp. Vol. Jan-Feb. 23(1): 1-5.

MARTÍNEZ MA., RESMINI E., BARAHONA MJ., SUCUNZA N. et al. (2009). Factores de riesgo cardiovascular entre pacientes con síndrome de cushing, curados y no curados con respecto a un grupo control. Enferm. Cardiol.Año XVI(47-48): 31-34.

MARTINS C., STROMMEN M., STAVNE O.A. et al. (2011). Bariatric surgery versus lifestyle interventions for morbid obesity—changes in body weight, risk factors and comorbidities at 1 year. Obes. Surg. Vol. Jul;21(7): 841-9.

MASERI A., LANZA G.A., SANNA T., et al. (2002). Flujo sanguíneo coronario e isquemia miocárdica. Hurst. EL corazón. Vol. 1. 10ª Edición en castellano. Ed. Fuster V., Wayne Alexander R., O'Rourke RA. Madrid: Mc Graw-Hill Interamerica; Cap. 37; pp. 1141-1162.

MINGRONE G., PANUNZI S., DE GAETANO A.et al. (2012). Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. N. Engl. J. Med.Vol. 366:1577-1585.

National Obesity Education Initiative of the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI). Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults--the evidence report. National Institutes of Health. (1998). Obes Res. Vol. Sep;6 (2):51S-209S.

NEARY N.M., BOOKER O.J., ABEL BS.et al. (2013). Hypercortidolism is associated with increased coronary arterial aterosclerosis: analysis of noninvasive coronary angiography using multidetector computerized tomography. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Vol. 98: 2045-2052.

NOHRIA A., GERHARD-HERMAN M., CREAGER MA. et al. (2006). Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volumen amplitude in humans. Journal of applied physiology. VOI. Aug. 101 (2): 545-548.

O'KANE, M., PARRETTI, H. M., HUGHES, C. A.et al. (2016). Guidelines for the follow-up of patients undergoing bariatric surgery. Clin. Obes. Vol. 6: 210–224.

- PAUL B., KALISWAL R.R. (2004). Dobutamine stress echocardiography-methodology, clinical applications and current perspectives. J. Assoc. Physicians India. Vol. 52: 653-7.
- PENNINGS F.A., INCA C., BOUMA G.J. (2006). Continuous real-time visualization of the human cerebral microcirculation during arteriovenous malformation surgery using orthogonal polarization spectral imaging". Neurosurgery. Vol. 59 (1): 167-71.
- PIVONELLO R, FAGGIANO A, LOMBARDI G, COLAO A. (2005). The metabolic syndrome and cardiovascular risk in Cushing's syndrome. Endocrinol. Metab. Clin. North Am.34(2): 327–339.
- PIVONELLO R., DE LEO M., COZOLLINO A. et al. (2015). The Treatment of Cushing's Disease. Endocr. Rev.Vol. 36 (4): 385-486.
- RAMÍREZ-MORENO A. (2003). Disección espontánea del tronco coronario izquierdo tratada mediante implantación de múltiples stents. Rev. Española de Cardiología. Vol. 56(4):417-420.
- REAVEN GM. (1993). Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. Annu. Rev. Med. Vol. 44:121–31.
- RESMINI E. (2004). Persistent Comorbidities in Cushing's Syndrome after endocrine cure. Advances in Endocrinology. Vol. 2014: 231-245.
- RIZZONI D., PORTERI E., DE CIUCEIS C. et al. (2009). Hypertrophic remodelling of subcutaneous small resistance arteries in patients with Cushing's syndrome. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Vol. 24:5010-5018.
- RODRÍGUEZ F., BANEGAS J.R., GARCÍA C. et al. (1996). Lower consumption of wine and fish as a possible explanation for higher ischaemic heart disease mortality in Spain's Mediterranean region. Int. J. Epidemiol.Vol. 25: 1196-201.
- ROSSI M., BRADBURY A., MAGAGNA A. et al. (2011). Investigation of skin vasoreactivity and blood flow oscillations in hypertensive patients: effect of short-term antihypertensive treatment. J. Hypertens. Vol. 29: 1569–1576.

ROSSI M., NANNIPIERI M., ANSELMINO M. et al.(2011). Skin vasodilator function and vasomotion in patients with morbid obesity: effects of gastric bypass surgery. *Obes. Surg.* Vol. 21: 87–94.

ROUSTIT M., BLAISE S., MILLET C. et al. (2010). Reproducibility and methodological issues of skin post-occlusive and termal hiperemia assessed by single-point laser Doppler flowmetry. *Microvascular. Res.* Vol. 79: 102-108.

ROUSTIT M., CRACOWSKI J.L. (2012). Non invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation.* Vol. 19 (1), 47-64.

ROUSTIT M., CRACOWSKI J.L. (2012). Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation.* Vol. 34: 373-384.

RYAN D.H., ESPELAND M.A., FOSTER G.D. et al. (2003). Look AHEAD (action for health in diabetes): Design and methods for a clinical trial of weight loss for the prevention of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Control Clin Trials.* Vol. Oct;24(5):610-28.

SALAS-SALVADO J., RUBIO M.A., BARBANY M. et al. (2007). Grupo Colaborativo de la SEEDO. SEEDO 2007 consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria. *Med Clin (Barc).* Vol. Feb 10;128(5):184-96.

SAMUEL I., MASON E.E., RENQUIST K.E.et al. (2006). Bariatric surgery trends: an 18-years report from the International Bariatric Surgery Registry. *Am. J. Surg.* Vol. 192: 657-662.

SÁNCHEZ-DE-LA-TORRE M., MEDIANO O., BARCELO A. et al. (2012). The influence of obesity and obstructive sleep apnea on metabolic hormones. *Sleep Breath.* Vol. Sep. 16(3):649-56.

SATO A., SUZUKI H., MURAKAMI M. et al. (1994). Glucocorticoid increases angiotensin II type 1 receptor and its gene expression. *Hypertension.* Vol. 23: 25-30.

SCHAUER P.R., KASHYAP S.R., WOLSKI K., et al. (2012). Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes. *N. Engl. J. Med.* Vol. 366:1567-1576.

SERNA E., DE JOUGH R., ETTO C. et al. (2007). Microvascular dysfunction. A potential pathophysiological role in the metab. síndrome” Hypertension. Vol. 50: 201-211.

SERNE E.H., DE JONGH R.T., ERINGA E.C. et al. (2007). Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome. *Hypertension*. Vol. 50: 204-211.

SHERMAN H., KLAUSNE S., COOK W.A. (1971). Incident dark-field illumination: a new method for microcirculation study. *Angiology*. Vol. 22: 295-303.

SJOSTROM L., LINDROOS A.K., PELTONEN M. et al. (2004). Swedish Obese Subjects Study Scientific Group: Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N. Engl. J. Med.* Vol. 351: 2683-2693.

SJOSTROM L., NARBRO K., SJOSTROM C.D. et al. (2007). Swedish Obese subjects study. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N. Engl. J. Med.* Vol. 357:741-52.

SJOSTROM L., GUMMESSON A., SJOSTROM C.D. et al. (2009). Swedish Obese Subjects Study: Effects of bariatric surgery on cancer incidence in obese patients in Sweden (Swedish Obese Subjects Study): a prospective, controlled intervention trial. *Lancet Oncol.* Vol. 10:653-662.

SJOSTROM L., PELTONEN M., JACOBSON P. et al. (2012). Bariatric surgery and long-term cardiovascular events. *JAMA*. Vol. 307:56-65.

SORIGUER F., GODAY A., J. VENDRELL et al. (2012). Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetología*. Vol. 55:88–93.

SOROP O., OLVER D., DE WOUW J. et al. (2017). The microcirculation: a key player in obesity-associated cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res*. Vol. 8: 1-26.

STACY A. BRETHAUER, HELEN M. HENEGHAN, SHAI ELDAR et al.(2011). Early effects of gastric bypass on endothelial function, inflammation, and cardiovascular. Surg. Endosc. 25:2650–2659.

STANESCU C. (2004). Exercise echocardiography in coronary artery disease. Rom. J. Intern. Med. Vol. 42: 473-89.

STEFFENSEN C., BAK A.M., RUBECK K.Z. et al. (2010). Epidemiology of Cushing's syndrome. Neuroendocrinology.Vol. 92 Suppl 1:1-5.

STIEFEL P., MORENO-LUNA R., VALLEJO-VAZ A.J. et al. (2012). Which parameter is better to define endothelial dysfunction in a test of postocclusive hyperemia measured by laser-Doppler flowmetry?. Coron. Artery Dis. Vol. 23: 57–61.

STURM W., TSCHONER A., ENGL J. et al. (2009). Effect of bariatric surgery on both functional and structural measures of premature atherosclerosis. Eur. Heart J. Vol. 30: 2038-43.

TESSELAAR E., SJÖEBERG F. (2011). Transdermal iontophoresis as an in-vivo technique for studying microvascular physiology. Microvascular Research. Vol. Jan.; 81 (1): 88-96.

TIBIRICA E., MATHEUS A.S., NUNES B. (2011). Repeatability of the evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser Doppler perfusion monitoring: clinical and statistical implications. Clinics (Sao Paulo).Vol. 66: 599-605.

TINAHONES MADUEÑO F.J. (2016). Tratado de Diabetes Mellitus” 2ª Edición. Ed. Panamérica. Madrid. España. Capítulo Síndrome metabólico. F.J., pág. 81-88.

TOJA P.M., BRANZI G., CIAMBELLOTTI F.et al. (2012). Clinical relevance of cardiac structure and function abnormalities in patients with Cushing’s síndrome before and after cure. Clinical Endocrinology. Vol. 76: 332-338.

VALASSI E., CRESPO I., SANTOS A, WEBB S. (2012). Clinical consequences of Cushing’s syndrome. Pituitary. Vol. 15:319–329.

VALASSI E., SANTOS A., YANEVA M., et al. (2011). ERCUSYN Study Group. The European Registry on Cushing's syndrome: 2-year experience. Baseline demographic and clinical characteristics. *Eur. J. Endocrinol.* Vol. 165:383–392.

VERDAT C.L. DE BACKER D., BRUHN A. et al. (2009). Evaluation of sublingual and gut mucosal microcirculation in sepsis: a quantitative analysis. *Crit. Care Med.* Vol. 37: 2875-81.

WALLERATH T., WITTE K., SCHAFER SC., et al. (1999). Down regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. *PNAS.* Vol. 96: 13357-13362.

WIDLANSKY M.E., GOKCE N., KEANEY J.F.J. et al. (2003). The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology.* Vol. Oct.; 42(7): 1149-1160.

WILLIAMS I.L., CHOWIENCZYK P., WHEATCROFT S. et al. (2005). Endothelial function and weight loss in obese humans. *Surg.* Vol. 15(7): 1055–1060.

WYATT S.B., WINTERS K.P., DUBBERT P.M. (2006). Overweight and obesity: Prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Am. J. Med. Sci.* Vol. Apr.331(4): 166-74.

YAMAMOTO-SUGANUMA R, ASO Y. (2009). Relationship between post-occlusive forearm skin reactive hyperaemia and vascular disease in patients with Type 2 diabetes: a novel index for detecting micro- and macrovascular dysfunction using laser Doppler owmetry. *Diabet. Med.* Vol. 26: 83–88.

YVONNE-TEE G.B., RASOOL A.H., RAHMAN A.R. (2005). Reproducibility of different laser Doppler fluximetry parameters of post occlusive reactive hiperemia in human forearms skin. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* Vol. 52: 286-292.

ZOCALO Y., BIA D. (2014). Presión aórtica central y parámetros clínicos derivados de la onda del pulso: evaluación no invasiva en la práctica clínica Importancia clínica y análisis de las bases metodológicas de los equipos disponibles para su evaluación. *Rev.Urug.Cardiol.* Vol.29 (2) 215-230.

10.1 ANEXO I



MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

Expediente Nº

TÍTULO:	
ESTUDIO DE LAS SECUELAS EN PACIENTES CON SÍNDROME DE CUSHING.	
Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro	
TIPO DE PROYECTO:	INDIVIDUAL <input type="checkbox"/> COORDINADO <input type="checkbox"/> MULTICÉNTRICO <input checked="" type="checkbox"/>
NOMBRE COORDINADOR/A (COORDINADOS O MULTICÉNTRICOS DE VARIAS SOLICITUDES): Silvia M. Aribas Rodríguez	
DURACIÓN:	3 años <input checked="" type="checkbox"/>
RESUMEN (Objetivos y metodología del proyecto): (Máximo 250 palabras)	
<p>Los pacientes con síndrome de Cushing curados presentan un número de secuelas que son las responsables de la persistencia de su morbilidad después de su curación. En este proyecto pretendemos estudiar si la presencia de déficit de GH, persistencia de síndrome metabólico, la utilización de tratamiento sustitutivo con hidrocortisona o el tiempo de evolución desde la curación se asocian a la persistencia de riesgo cardiovascular, a las alteraciones neurocognitivas y/o a la persistencia de las alteraciones óseas. Estudiaremos además la asociación de marcadores bioquímicos y funcionales del riesgo cardiovascular, de las alteraciones del hueso y neurocognitivas para cada una de las variables predictivas (déficit de GH, persistencia de síndrome metabólico y tratamiento sustitutivo con hidrocortisona). Para responder a cada uno de los objetivos planteados se ha realizado un diseño de estudio de casos y controles prospectivo con un cálculo muestral de 84 pacientes. En cada uno de los grupos se estudiarán la presencia de las secuelas de mayor impacto sobre la morbilidad de estos pacientes (riesgo cardiovascular, alteraciones neurocognitivas y óseas) y el grado y la evolución de las mismas tras 24 meses de seguimiento y su relación con la presencia o ausencia de síndrome metabólico, déficit de GH, tratamiento con hidrocortisona y tiempo de evolución desde la curación del Síndrome de Cushing. Al mismo tiempo se realizarán determinaciones de marcadores plasmáticos de disfunción endotelial y óseos y test neurocognitivos que evalúen la asociación de las complicaciones en función de la dependencia o no a la enfermedad inicial.</p>	
TITLE:	
Sequels assessment in patients with cured Cushing's syndrome.	
SUMMARY (Objectives and methodology):	
<p>The patients with cured Cushing's syndrome have a number of sequelae that are responsible for the increase of their morbidity. In this project we aim to analyze if the presence of GH deficit, metabolic syndrome phenotype, the replacement treatment with hydrocortisone or the elapsed time from the cure are associated with the persistence of cardiovascular risk, with neurocognitive and/or bone alterations. We will analyze also the association of biochemical and functional cardiovascular and bone risk markers and morphologic and neurocognitive alterations with GH deficit, metabolic syndrome and with hydrocortisone replacement. To answer these questions a study of cases and controls has been designed.</p>	



MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

Investigador/a principal: **Alfonso Leal Cerro**Antecedentes y estado actual del tema (Citar las referencias incluidas en el apartado siguiente)
(Máximo 3 páginas)

El Síndrome de Cushing (SC) es una enfermedad que se caracteriza por la elevación de cortisol de origen endógeno (dependiente o independiente de ACTH). Su incidencia está estimada en aproximadamente 4.5 casos por 100.000 habitantes por año y su prevalencia en aproximadamente 40 casos por millón de habitantes. Las manifestaciones clínicas que caracterizan el síndrome de Cushing son fundamentalmente la ganancia de peso rápida (obesidad central), hipertensión arterial, fracturas espontáneas sobre todo de cuerpos vertebrales, depresión, diabetes mellitus y debilidad muscular entre otras. Entre todas las secuelas del hipercortisolismo, las complicaciones cardiovasculares son las más frecuentes y severas causando una mortalidad 4 veces mayor a la esperada en la población normal (1-3). La alta prevalencia de enfermedad vascular se ha relacionado con la existencia de hipertensión arterial sistémica, obesidad, intolerancia a la glucosa, insulina resistencia, hiperlipidemia y alteraciones de la coagulación (4,5). Otras secuelas sistémicas frecuentes del efecto de los glucocorticoides que repercuten sobre la morbilidad de los pacientes con SC son las relacionadas con las alteraciones neurocognitivas (6) y con la osteoporosis (7). Tras la remisión del hipercortisolismo existe una disminución o mejoría de cada una de ellas sobre todo del riesgo cardiovascular ya que en la mayor parte de los casos la hipertensión y/o la diabetes desaparecen. Sin embargo, en los pacientes curados después de cirugía, persiste una mayor prevalencia de los riesgos cardiovasculares a pesar de la remisión de la enfermedad (2-4, 8,9).

Se conoce y está bien estudiado que el aumento del riesgo cardiovascular está directamente relacionado con la exposición a los glucocorticoides aunque no ha sido posible determinar el grado de lesión cardiovascular en relación a la severidad y tiempo de impregnación cortisólica (11,12). La alta prevalencia de hipertensión, obesidad, insulina resistencia, intolerancia a la glucosa y dislipidemia podrían explicar el elevado riesgo de enfermedad cardiovascular en estos pacientes. Sin embargo en comparación con una población control por edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), presión arterial (PA), perfil lipídico, tolerancia a la glucosa y valores de insulina equivalentes, los pacientes con SC muestran un aumento del grosor de la íntima-media y un mayor número de placas de ateroma que los controles (7, 8, 13, 14). A pesar de que ambos grupos tienen factores de riesgo vascular similares, los pacientes con SC tienen una lesión vascular más severa lo que podría explicar la evidencia del aumento de la mortalidad por eventos cardiovasculares en estos pacientes. Se ha constatado que la persistencia del aumento del riesgo cardiovascular tras un año desde la curación podría correlacionarse con la persistencia de las alteraciones metabólicas (obesidad visceral e insulina resistencia principalmente) que se mantienen en un número elevado de pacientes tras la curación del hipercortisolismo (15). Aunque este aumento del riesgo cardiovascular en los pacientes curados se ha explicado en relación a la exposición presente (Cushing activo) y pasada (Cushing curado) a los glucocorticoides, hasta la fecha no ha sido posible demostrar esta relación. La asociación de la exposición prolongada al cortisol con enfermedad cardiovascular podría ser un sustituto de la acción de otros factores que afectan a la arteriosclerosis en estos pacientes, como la insulina resistencia que contribuye a la manifestación y progresión de la enfermedad cardiovascular, bien directamente y/o a través de sus consecuencias metabólicas (diabetes mellitus, hipertensión y dislipidemia). Debido a que los pacientes con SC presentan enfermedad cardiovascular asociada con síndrome metabólico y que éste prevalece tras la curación y que el tratamiento con hidrocortisona está indicado en algunos casos, se podría sugerir una asociación entre la severidad de las manifestaciones metabólicas y/o la dependencia de tratamiento sustitutivo y el aumento del riesgo cardiovascular, aunque esta asociación no ha sido demostrada. Tras la curación del hipercortisolismo la mayoría de los pacientes mantienen una dependencia temporal de tratamiento sustitutivo con hidrocortisona y solo en una baja proporción este tratamiento se mantiene durante toda la vida. Aunque las dosis de 10-12 mg/m² de superficie corporal se han considerado sustitutivas no se conocen sus efectos metabólicos en los pacientes que previamente ha estado expuestos a dosis excesivas.

Memoria de solicitud del proyecto de investigación: Antecedentes y estado actual del tema

Página 2 de 20



MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente Nº

Los pacientes con síndrome de SC muestran también alteraciones neurocognitivas de considerable gravedad (16). Según datos epidemiológicos, los trastornos neurocognitivos están presentes en un 37-50% de los casos. Dentro de estos trastornos, los trastornos de memoria son los más frecuentes presentándose en un 83% de los pacientes (17). El cerebro es un importante receptor de las hormonas segregadas en la corteza adrenal, siendo especialmente alto el número de receptores de glucocorticoides (GC) (18). Entre las regiones cerebrales ricas en estos receptores podemos señalar el hipocampo y la corteza prefrontal (10), áreas cuya función se encuentran íntimamente ligadas a procesos psicológicos superiores tales como el aprendizaje, la memoria declarativa y las funciones ejecutivas (20). En el caso del SC, así como en otras condiciones donde existe una exposición prolongada a los GC, se ha documentado un efecto neurotóxico evidenciado por una marcada atrofia cortical, sobre todo en regiones hipocámpales (21) y en regiones de la corteza prefrontal (22). Sin embargo, los estudios longitudinales en pacientes con SC curados muestran una persistencia de los trastornos neurocognitivos y la no completa resolución de la atrofia cortical, al menos en un período a corto-medio plazo (13-16 meses) desde la resolución del hipercortisolismo (23,24). No obstante, los factores que predisponen o mantienen estos trastornos aún no se conocen, así como la evolución de los mismos a más largo plazo.

Entendemos que entre los factores asociados al mantenimiento de las secuelas descritas sería necesario estudiar ciertas alteraciones frecuentemente al SC, las cuales han mostrado ejercer una influencia determinante en la presencia y persistencia de complicaciones en otras patologías: presencia de un déficit de GH (25), y el tratamiento continuado con glucocorticoides (26).

La secuela más antigua y mejor conocida del SC es la osteoporosis (27). La prevalencia de osteoporosis y fracturas en pacientes con SC oscila entre el 74-76% (28,29). El tiempo desde la curación del hipercortisolismo, la persistencia de la actividad estrogénica y sobre todo la acción de los andrógenos son los factores mejor conocidos que correlacionan con la remodelación ósea y con la normalización de la densidad mineral ósea (30-32). Sin embargo la repercusión de otros factores como el déficit de GH o la obesidad sobre el curso de esta mejoría no está bien establecido, aunque sí se conoce el beneficio del tratamiento con GH y el exceso de adiposidad sobre el crecimiento lineal y la talla final en niños con SC curados (33,34).

En pacientes con SC la secreción de GH está inhibida bien como consecuencia del propio hipercortisolismo (35-37), como consecuencia de la cirugía o de la radioterapia hipofisaria o como consecuencia del exceso de peso habitual en estos pacientes (38). En ausencia de radioterapia o hipopituitarismo postquirúrgico se ha demostrado persistencia del déficit de GH después de más de 2 años desde la curación del hipercortisolismo en más del 60% de los pacientes estudiados (39). Las consecuencias metabólicas del déficit de GH vienen definidas por un aumento de la mortalidad de causa vascular relacionada con la presencia de síndrome metabólico (40).

Sin embargo son pocos los trabajos que plantean un estudio de la evolución de las secuelas en los pacientes con SC curados y sobre todo de las causas que justifican el aumento de su mortalidad.



MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente Nº

Investigador/a principal: **Alfonso Leal Cerro**

Bibliografía más relevante (Máximo 1 página)

1. Etxabe J, Vázquez JA. Clin Endocrinol (Oxf), 1994; 40(4):479-84.
2. Singer E, Strohm S, Göbel U et al. Hypertension., 2008; 52(6):1001-5.
3. Lindholm J, Juul S, Jørgensen JO, Astrup J et al. J Clin Endocrinol Metab., 2001; 86(1):117-23.
4. Colao A, Cuocolo A, Di Somma C et al. J Clin Endocrinol Metab., 1999; 84(11):3950-5.
5. Ambrosi B, Sartorio A, Pizzocaro A, et al. Exp Clin Endocrinol Diabetes., 2000;108(4):294-8.
6. Starkman MN, Giordani B, Berent S, et al. Psychosom Med., 2001;63(6):985-93.
7. Endemann DH, Fischereder M, Leingartner T, et al. Am J Nephrol, 2001; 21(3): 245-8.
8. Miyamori I, Iki K, Takeda R. Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi., 1994; 70(1): 25-30.
9. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Circulation., 2003; 108: 2054 – 2059
10. Endemann DH, Schiffrin EL. J. Am. Soc. Nephrol., 2004; 15: 1983 - 1992.
11. Caro A. Marcadores de riesgo cardiovascular en pacientes con hipercortisolismo endógeno. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. Director Leal Cerro A, 2009.
12. Denis CV. Pathol Biol (Paris). 2003; 51(7):395-6.
13. Kirilov G, Tomova A, Dakovska L, et al. Eur. J. Endocrinol., 2003; 149: 549 - 553.
14. Kelly JJ, Mangos G, Williamson PM, et al. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl. 1998; 25:S51-6.
15. Faggiano A, Pivonello R, Spiezia S, et al. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(6):2527-33.
16. Forget H, Lacroix A, Somma M, et al. J Int Neuropsychol Soc. 2000;6(1):20-9.
17. Starkman MN, Schteingart DE, Schork MA. Psychosom Med. 1981; 43(1):3-18.
18. McEwen BS. Hosp Pract (Off Ed). 1988;23(8):107-11, 114, 119-21.
19. Lupien SJ, McEwen BS. Brain Res Brain Res Rev. 1997 ;24(1):1-27.
20. León-Carrión, J, Madrazo A, Mangas MA, et al. Clin Endocrinol (Oxf). 2009 ;70(2):192-200.
21. Starkman MN, Gebarski SS, Berent S, et al. Biol Psychiatry., 1992 ;32(9):756-65.
22. Gold SM, Dziobek I, Rogers K, et al. J. Clin. Endocrinol. Metab., 2005; 90 (6): 3262 - 3267.
23. Starkman MN, Giordani B, Gebarski SS, et al. Biol Psychiatry., 1999;46(12):1595-602.
24. Forget H, Lacroix A, Cohen H. Psychoneuroendocrinology. 2002 ;27(3):367-83.
25. Falletti MG, Maruff P, Burman P, et al. Psychoneuroendocrinology. 2006 ;31(6):681-91.
26. Roozendaal B, de Quervain DJ. Neurology. 2005;64(2):184-5.
27. Sissons HA. J Bone Joint Surg Br. 1956 ;38-B(1):418-33.
28. Tauchmanová L, Pivonello R, Di Somma C, et al. J Clin Endocrinol Metab. 2006 ;91(5):1779-84.
29. Chiodini I, Scillitani A. Recenti Prog Med. 2008 ;99(6):309-13.
30. Kristo C, Jemtland R, Ueland T, et al. Eur J Endocrinol. 2006;154(1):109-18.
31. Kawamata A, Iihara M, Okamoto T, et al. World J Surg. 2008 ;32(5):890-6.
32. Tauchmanová L, Pivonello R, De Martino MC, et al. Eur J Endocrinol. 2007 ;157(3):359-66.
33. Lebrethon MC, Grossman AB, Afshar F, et al. J Clin Endocrinol Metab. 2000 ;85(9):3262-5.

MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

Investigador/a principal: **Alfonso Leal Cerro****Hipótesis**

Los pacientes con síndrome de Cushing (hipercortisolismo endógeno) tienen una mayor prevalencia de complicaciones cardiovasculares, de alteraciones neurocognitivas y de osteoporosis. Estas complicaciones mejoran o desaparecen tras la curación del hipercortisolismo. Sin embargo, la persistencia de estas secuelas es un hecho constatado ya que tanto el riesgo cardiovascular, la prevalencia de alteraciones neurocognitivas como el riesgo de fracturas es mayor en pacientes que han tenido un Cushing a pesar de su curación que en los individuos que no han padecido esta enfermedad.

La hipótesis que planteamos a partir de estas premisas es que la persistencia de las complicaciones tanto las relacionadas con el riesgo cardiovascular, alteraciones neurocognitivas y óseas puedan relacionarse con la presencia de déficit de GH, con la persistencia de síndrome metabólico, con la toma de tratamiento sustitutivo con hidrocortisona o con el tiempo desde la remisión de la enfermedad.

Objetivos**Objetivos Principales:**

1. Analizar si la presencia de déficit de GH, obesidad visceral, la utilización de tratamiento sustitutivo con hidrocortisona o el tiempo de evolución desde la curación se asocian con la persistencia de riesgo cardiovascular.
2. Analizar si la presencia de déficit de GH, persistencia de síndrome metabólico, la utilización de tratamiento sustitutivo con hidrocortisona o el tiempo de evolución desde la curación se asocian con la persistencia de alteraciones neurocognitivas.
3. Analizar si la presencia de déficit de GH, persistencia de síndrome metabólico, la utilización de tratamiento sustitutivo con hidrocortisona o el tiempo de evolución desde la curación se asocian con la persistencia de alteraciones óseas.

Objetivo secundario:

1. Analizar la asociación de marcadores bioquímicos y funcionales de riesgo cardiovascular con la persistencia del riesgo cardiovascular para cada una de las variables predictivas de déficit de GH, persistencia de síndrome metabólico y tratamiento sustitutivo con hidrocortisona.
2. Analizar la asociación de marcadores bioquímicos de riesgo de las alteraciones del hueso y morfológicas y cognitivas para cada una de las variables predictivas de déficit de GH, persistencia de síndrome metabólico y tratamiento sustitutivo con hidrocortisona.

MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro

Metodología (Diseño, sujetos de estudio, variables, recogida y análisis de datos y limitaciones del estudio)
(Máximo 3 páginas)**DISEÑO.**

Para responder a cada uno de los objetivos planteados se ha realizado un diseño de estudio de casos y controles prospectivo.

SUJETOS DE ESTUDIO

El grupo de estudio estará constituido por pacientes con SC curados. Se entenderá por síndrome de Cushing curado aquellos pacientes que tras una cirugía hipofisaria o adrenal tengan valores de cortisol libre urinario normales, cortisol en saliva nocturno normal y cortisol plasmático y/o en saliva tras frenación con 1 mg de dexametasona normales tras un periodo de 3-6 meses desde la intervención. De igual forma se consideran pacientes normales aquellos pacientes que tras la cirugía precisen tratamiento sustitutivo con hidrocortisona y no se les pueda suspender. De esta muestra se obtendrán la población de casos y controles a estudiar.

DEFINICION DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Casos: El grupo de casos estará constituido por pacientes que reúnan criterios de síndrome de Cushing curado y con presencia de secuelas.

La presencia de secuelas vendrá definida por los siguientes criterios:

Riesgo cardiovascular: Para la valoración del riesgo cardiovascular se utilizarán los criterios definidos por la American Heart Association (AHA) que incluye criterios de riesgo mayores e independientes como el tabaquismo, la hipertensión, elevación del colesterol total y de LDL, disminución de HDL, diabetes mellitus y de la edad y de otros factores de riesgo predisponentes como la obesidad y la actividad física. En nuestra valoración inicial del riesgo cardiovascular no utilizaremos los marcadores de inflamación o de disfunción endotelial para la clasificación de los grupos ya que excepto para la PCR que ha sido la mejor estudiada desde el punto de vista de la práctica clínica, el resto de marcadores no han demostrado una utilidad en la definición del riesgo cardiovascular en la población.

Alteraciones Neurocognitivas: Para determinar la presencia de alteraciones neurocognitivas nos basaremos en los baremos de pruebas neuropsicológicas. Puesto que nuestra función de interés es la función mnésica la puntuación de cada paciente en las pruebas de memoria será comparada con los baremos publicados en población española de la Batería Neuropsicológica de Sevilla (curva de memoria de Luria; BNS; León-Carrión, 1995) y la Wechsler Memory Scale-III (*Memory Quotient*; WMS-III). Una desviación mayor de 2 desviaciones típicas (DT), en alguno de los dos baremos, será considerado como alteración significativa de la memoria. Consideraremos un funcionamiento normal o normalizado cuando la ejecución de los pacientes se sitúe entre -2 y 2 desviaciones típicas.

Para determinar la alteración volumétrica cerebral de nuestras áreas de interés (hipocampo y corteza prefrontal) nos basaremos en criterios radiológicos (presencia/ausencia de alteración en estas áreas), así como criterios cuantitativos. Para estos últimos nos basaremos en los publicados por Pruessner et al. (2000) para la formación hipocámpica, y los de Collins et al. (1998), para la corteza prefrontal. Diferencias mayores o igual a -2 DT con respecto a estos datos serán considerados como alteraciones significativas. Asimismo, diferencias menores a -2 DT serán consideradas normales o normalizadas.

Osteoporosis: Para definir la presencia o ausencia de osteoporosis se utilizarán los criterios de la Organización Mundial de la Salud (WHO) que clasifica las alteraciones de la pérdida mineral ósea en función de la densidad mineral ósea (DMO) medida por técnicas de absorción dual de rayos X con equipo Hologic®. Se considera la presencia de osteoporosis cuando existe una DMO por debajo de -2.5 del T score. La osteoporosis se define como severa cuando existe una fractura espontánea no traumática. La osteopenia es una disminución de la DMO que puede ser una condición precursora de osteoporosis. Se define como una disminución de la DMO cuando existe una T score menor de -1.0 y mayor de -2.5. Los valores de normalidad vienen definidos por un T score mayor de -1.0. Desde el punto de vista del manejo clínico, sobre todo para valorar su

Memoria de solicitud del proyecto de investigación: Metodología
Página 6 de 20



MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

evolución o los efectos de un tratamiento tiene interés calcular el riesgo de fractura según los criterios de la WHO. La presencia de osteoporosis vendrá también definida por la necesidad de toma de fármacos.

Controles: El grupo de controles estará constituido por pacientes con SC curados con mejoría o normalización de las secuelas. Se entenderán por normalización de las secuelas el cambio a los criterios de normalidad para edad y sexo. Por mejoría de las secuelas se entenderán cambios de los valores previos de más del 50 hacia la normalidad.

TAMANO MUESTRAL

Asumiendo una diferencia clínicamente relevante de las complicaciones del 30% entre los casos y controles con síndrome de Cushing, teniendo en cuenta que el nivel de significación es 5%, necesitaríamos analizar 84 individuos (42 por grupo), para tener una potencia del 90%.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Edad 18-70 años.

Haber tenido un síndrome de Cushing cualquiera que sea su origen (hipofisario, adrenal o ectópico) que en el momento del inicio del estudio lleve un tiempo de evolución mínimo desde la curación de seis meses. Se entenderá por curación la normalización del CLU en al menos dos muestras de orina de 24 horas (< de 360 nmol/L a las 24 horas), la existencia de un cortisol nocturno en saliva < de 10 nmol/L y cortisol en saliva tras frenación nocturna con 1 mg de dexametasona de < de 8.5 nmol/L o plasmático menor de 55 nmol/L.

Estar alfabetizado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes con Cushing curado en los que además de la cirugía se haya utilizado tratamiento con radioterapia hipofisaria.

Presencia de hipopituitarismo (uno o más déficits hipofisarios distintos a GH).

Gestación.

Abuso de alcohol u otro tipo de drogas

Historia de trastorno psiquiátrico grave o enfermedad neurológica

Déficits visuales y daltonismo

Todos los pacientes incluidos serán adecuadamente informados sobre las características y finalidad del estudio y firmarán el consentimiento informado, previamente a su inclusión (Anexo 2). Este estudio cumple las normas éticas recomendadas por la VII Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (2002) y por el Convenio de Oviedo (1997-2000).

VARIABLES

Definición de las variables de asociación:

- Edad
- Sexo
- Tabaco
- Diagnóstico: Síndrome de Cushing curado y comorbilidades.
- Tiempo de evolución: Síndrome de Cushing activo/curado.
- Medidas antropométricas: Índice de masa corporal (IMC), perímetro de la cintura. Las variables antropométricas se tomarán con el paciente en ropa ligera y sin zapatos.
- Medidas de PA.
- Parámetros de control metabólico: Se realizarán mediante extracción de sangre en vena antecubital después de 10 horas de ayuno para la determinación de glucemia, hemoglobina glicosilada, triglicéridos, LDL-colesterol, HDL-colesterol, Apo-A1 y Apo-A2. Estas determinaciones, excepto la hemoglobina glicosilada serán determinadas en suero mediante técnicas de espectrofotometría por métodos comerciales estandarizados en el Hospital. La hemoglobina glicosilada se realizará por inmunoturbidimetría en sangre total y sus resultados serán expresados en %. La insulinoresistencia se valorará mediante el índice IR-HOMA calculado como glucosa (mmol/L)xinsulina (mcU)/22.5. La determinación de insulina se practicará por electroquimioluminiscencia mediante técnica comercial (Roche Diagnostic) expresándose los resultados en µU/ml.
- La presencia de *síndrome metabólico* vendrá definida cuando existan al menos 3 de los

Memoria de solicitud del proyecto de investigación: Metodología
Página 7 de 20

MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

cinco criterios definidos por la AHA; 1) perímetro de la cintura (≥ 102 cm en el hombre y ≥ 88 en la mujer), 2) elevación de triglicéridos (≥ 150 o el estar haciendo tratamiento farmacológico para disminuir los triglicéridos), 3) disminución de HDL-C (< 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres o toma de drogas para reducir el HDL-C), 4) presión arterial elevada (≥ 130 mm HG o toma de drogas hipotensoras), 5) glucosa en ayunas elevada (≥ 100 mg/dL o toma de fármacos para controlar la glucemia).

- El **déficit de GH** vendrá definido cuando la respuesta de GH a una prueba de hipoglucemia inducida con insulina (bolo i.v. de 0.05-0.1 U/kilo de peso H.I.I.) efectiva (glucemia < 2.2 mmol/L sea inferior a 5 ng/ml).
- La necesidad de **tratamiento sustitutivo con hidrocortisona** viene determinada por la presencia de una insuficiencia suprarrenal (cortisol plasmático a las 9 de la mañana ≤ 130 nmol/L y pico tras estimulación con ACTH < 500 nmol/L) no recuperable tras la intervención. Aunque la dosis de hidrocortisona se ajusta a razón de 10-12 mg/kilo de peso y día, las dosis habituales oscilan entre los 20 y 30 mg/día repartidos en dos tres veces al día.
- La **variable tiempo** (desde la curación hasta el inicio del estudio) vendrá definida por un intervalo de tiempo mínimo de seis meses desde la curación hasta 20 años y se agruparán por intervalos de 5 años.

Variables dependientes:

- **Parámetros de control de la impregnación cortisólica:** Los parámetros de valoración de la impregnación cortisólica incluyen la determinación de cortisol libre en orina de 24 horas, la determinación del cortisol en saliva nocturno (23 h) y cortisol en saliva y plasma tras frenación con 1 mg de dexametasona y la determinación del cortisol en saliva nocturno y tras frenación con 1 mg de dexametasona. Estas determinaciones serán determinadas por técnicas de electroquimioluminiscencia.
- **Parámetros de riesgo cardiovascular:** El estudio del riesgo cardiovascular se realizará valorando los criterios de la AHA definidos anteriormente y de otra parte midiendo marcadores solubles de la disfunción endotelial (marcadores bioquímicos) y mediante la utilización de un método que evalúa la respuesta endotelial del vaso in vivo (flujimetria):

Marcadores bioquímicos:

Entre los marcadores bioquímicos se valorarán:

Marcadores de disfunción endotelial: Medición de PAI-1, VCAM1, endotelina-1 (ET-1):

Las concentraciones de PAI-1 se realizarán mediante método cromogénico (Siemens Diagnostic). Los niveles de VCAM1, SCL40 y ET-1 serán valorados en suero por un EIA comercial (R&D system). Los resultados serán expresados en ng/ml.

Marcadores de inflamación: Medición de sTNFR2, Adiponectina y IL-6 en suero: La concentración en suero de sTNFR2, Adiponectina y IL-6 será medida con los siguientes ensayos de ELISA: sTNF-RII EASITM ELISA kit (Biosource Europe S.A., Belgium), Adiponectin ELISA kit (Linco Research., Missouri, USA), HS IL-6 ELISA (Bender Medsystems, USA). Serán realizadas siguiendo las instrucciones del fabricante. El coeficiente de variación inter- e intra-placa oscila entre el 2 y el 10 % para los tres ensayos. **Medición de PCRus (Proteína C Reactiva ultrasensible):** La PCR ultrasensible se medirá en suero mediante técnica comercial (DADE Behring INC) por inmunonefelometría expresándose los resultados en $\mu\text{g/L}$.

Marcadores de estrés oxidativo: Óxido nítrico (NO), dimetil arginina asimétrica ADMA y LDL oxidada: El método de determinación de óxido nítrico es un análisis colorimétrico en suero mediante un kit comercial (Roche). Los niveles de ADMA y ET-1 serán valorados en suero por un EIA comercial (R&D system). La actividad de lipoperoxidación se calculará mediante la determinación de LDL oxidada en suero por EIA (Oxford Biochemical Research, Oxford, Mich). **Capacidad antioxidante total (TAS):** La capacidad antioxidante total (TAS) se cuantificará de acuerdo con la técnica de Uotila y cols. Free Radic., Biol. Med. 16:581-590, 1994.

Marcadores biofísicos:

Entre los marcadores biofísicos que evalúan la disfunción endotelial se incluirá: Valoración del flujo capilar mediante flujimetria con ecodoppler laser según procedimiento normalizado de



MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

trabajo para valorar la capacidad de vasodilatación y vasoconstricción de capilares de resistencia periféricas (test de isquemia prolongada y tras prueba de vasodilatación con nitroglicerina y vasoconstricción con acetilcolina). En condiciones de ayunas (8-12 h antes del estudio) y en temperatura ambiente de 22 °C y con medida de la temperatura de la piel 32-34° C, sin ingerir sustancias que puedan modificar la vasodilatación mediada por flujo 4-6 h antes de realizar la prueba (café, comidas grasas, vitamina C, tabaco), no haber realizado previamente ejercicio y con supresión de medicación vasoactiva 4 días antes de realizar la prueba siempre que sea posible. La prueba se realizará en la Unidad Apoyo a la investigación y ensayos clínicos Fase I-II, donde está instalado el equipo de flujimetría de láser doppler (flujímetro Láser-Doppler Periflex system 5000 (Perimed, Järfälla, Estocolmo, Suecia). Se realizarán el estudio de hiperemia reactiva tras isquemia prolongada y tras prueba de vasodilatación con nitroglicerina y vasoconstricción con acetilcolina según procedimiento normalizado de trabajo en la Unidad. Tras un periodo de reposo acostado de 30-60 minutos se le colocan al paciente un "manguito" de medida de la presión arterial sin insuflar en el brazo y el dispositivo láser en el antebrazo derecho, a una distancia de 5 cm de la muñeca. Tras alcanzar una temperatura cutánea normal y estable y completar 15-30 minutos de reposo, se activa el sistema de medida de las Unidades de Perifusión para evaluar la situación basal. Cuando el registro representa la situación basal se insufla el manguito de la presión rápidamente 50 mm por encima de la presión sistólica y permanece así durante 4 minutos. Durante este periodo, el monitor del sistema debe mostrar que las unidades de perfusión han caído de forma uniforme hasta casi alcanzar el valor de 0. Al terminar este periodo, se desinfla el manguito igualmente de forma rápida y el monitor mostrará un súbito incremento por encima del valor de pre-isquemia. Durante todo este periodo, el software habrá ido recogiendo la perfusión. Tras marcar el punto que hemos considerado de pre-isquemia (basal) se calculan automáticamente los siguientes parámetros: flujo basal (UP), incremento del flujo tras el estímulo (valores absolutos y porcentuales), velocidad a la que se produce dicho incremento, y relación entre el área de hiperperfusión tras isquemia y de hipoperfusión durante la isquemia. Los parámetros a analizar serán: PORHmax (PU), PORH max/t1 (PU/s), PORH (%), y relación área PORH/OI.

- **Parámetros de medida del déficit morfoneurocognitivo:** Los parámetros de medida del déficit morfoneurocognitivo se realizarán de una parte valorando los aspectos neurocognitivos mediante la utilización de tests neuropsicológicos estandarizados y baremados para la población española. Estos tests han mostrados alta sensibilidad a la presencia de trastornos de memoria de origen orgánico. Estos tests evalúan diferentes aspectos de la memoria y aprendizaje dependientes de nuestras áreas cerebrales de interés: formación hipocámpica y corteza prefrontal. Sobre estas áreas también se realizarán un análisis volumétrico cerebral por resonancia magnética nuclear (RMN).

Estudio neurocognitivo:

Los pacientes de los dos grupos serán evaluados neurocognitivamente usando las siguientes Tests:

Test para la evaluación del aprendizaje y memoria declarativa:

La curva de memoria de Luria-revisada de la Bateria Neuropsicológica Sevilla 2.0 (BNS 2.0): prueba informatizada que consiste en el aprendizaje (evaluado con una prueba de recuerdo inmediato) y recuerdo diferido, de una serie de 10 palabras sin asociación semántica. Se obtienen parámetros cuantitativos y cualitativos de la ejecución.

Pruebas de memoria a corto plazo y memoria de trabajo de la batería Wechsler Memory Scale III (WMS-III): evaluaremos, mediante pruebas verbales y no verbales, los componentes de la memoria a corto plazo y el control ejecutivo de la misma mediante pruebas de *span* mnésico y manipulación de la información en la memoria a corto plazo. Incluimos las pruebas *Dibujos*, *Localización espacial*, *Dígitos inversos y directos*, y *Letras y Números*. Para cada paciente obtendremos un dato global de la ejecución en estas pruebas (*Memory Quotient*), corregido según la edad.

Además, todos los sujetos se someterán a una evaluación de otras áreas neurocognitivas: *Atención* (test de atención simple de la BNS 2.0, Trail Making Test Parte A), y *Funcionamiento ejecutivo* (torre de Hanoi/Sevilla de la Bateria Neuropsicológica Sevilla y el



MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

test informatizado de Stroop, ambas incluidas en BNS y Trail Making Test parte B). Además controlaremos los cambios en *aspectos emocionales y de calidad de vida* a través de la Escala de Depresión de Beck, y el Cuestionario de Calidad de Vida específico para el Síndrome de Cushing "CushingQoL".

Análisis volumétrico cerebral por resonancia magnética nuclear (RMN)

Adquisición de imágenes por RMN: Los pacientes de cada grupo serán examinados en un sistema de RMN $\geq 1,5$ T dentro de las dos semanas después de la evaluación neurocognitiva. Para el análisis volumétrico, se obtendrán imágenes cerebrales potenciadas en T1 [124 cortes en el plano sagital; tridimensionales con imagen EG; tiempo de repetición (TR) = 35 ms; tiempo constante de eco (TE) = 9 ms; ángulo opuesto = 30°; matriz = 256X256 mm; campo de visión = 240 mm; grosor del corte = 0,8 mm]. También se obtendrán imágenes estructurales potenciada en densidad protónica y potenciada en T2 doble eco con secuencias eco del espín rápido (TR = 3500 ms; TE = 12/102 ms; número de excitaciones = 2; grosor del corte/gap = 4/1 mm).

Análisis volumétrico de las regiones de interés: hipocampo y corteza prefrontal: Para el análisis volumétrico, un neurorradiólogo analizará todas las imágenes de manera ciega con respecto al grupo de pertenencia del paciente. Para el análisis volumétrico del hipocampo seguiremos los métodos estándar que han mostrado mayor fiabilidad y validez. Este método se resume de la manera siguiente: se delimita manualmente los límites del hipocampo (incluyendo el asta de Ammon, el giro dentado y el *subiculum*) usando herramientas computarizadas sobre imágenes coronales reformateadas de 1,5 mm de grosor de corte. Las estructuras se medirán en su total extensión y se usarán múltiples orientaciones de la imagen para separar el hipocampo de la amígdala cerebral). Los volúmenes del hipocampo derecho e izquierdo serán promediados y tal medida será tomada como única para las comparaciones en cada paciente (ver figura 1 izquierda).

Para el cálculo del volumen de la corteza prefrontal (CPF), incluyendo el cortex prefrontal dorsal y el cortex orbitofrontal se seguirá el siguiente método: sobre las imágenes y utilizando el sistema computarizado antes descrito, se dibujarán los bordes de las regiones prefrontales de interés. Se delimitarán los bordes del cerebro entero, y las regiones dorsolaterales y orbitales. Este procedimiento lo llevará a cabo dos neurorradiólogos, siendo necesario una fiabilidad interjueces por encima del 95%. Para este análisis, la corteza prefrontal será delimitada sobre los cortes sagitales. Las regiones prefrontales dorsales y orbitales se separarán tomando como punto de referencia la comisura anterior. El *genu* del cuerpo calloso en la línea media delimita el borde posterior de la corteza prefrontal dorsal. Para el cálculo volumétrico de la región prefrontal orbital también se utilizará cortes sagitales. Para esta región, el límite superior se sitúa en la línea horizontal creada por la comisura anterior, y como límite posterior se usará el borde anterior del diencefalo en los cortes mediales, y la cisura silviana en los cortes laterales. La parte inferior de la corteza prefrontal orbital no comparte límites con otras estructuras cerebrales, por lo que la delimitación de este límite es de fácil ejecución (ver figura 1 derecha).

Con el objetivo de corregir según los diferentes tamaños de las cabezas, se calculará el volumen cerebral midiendo los compartimentos delimitados por la duramadre y el *tentorium* cerebral. Se obtendrá una medida global del líquido cefalorraquídeo (LCR) usando un procedimiento de umbral para calcular el volumen de LCR dentro del volumen total cerebral. El volumen cerebral total se calculará sustrayendo el volumen de LCR al volumen total de la bóveda craneal. Para la determinar de presencia/ausencia de alteración neuromorfológica nos basaremos en el diagnóstico neurorradiológico, así como en la presencia de más de 2 desviaciones típicas de los datos volumétricos.

MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente Nº

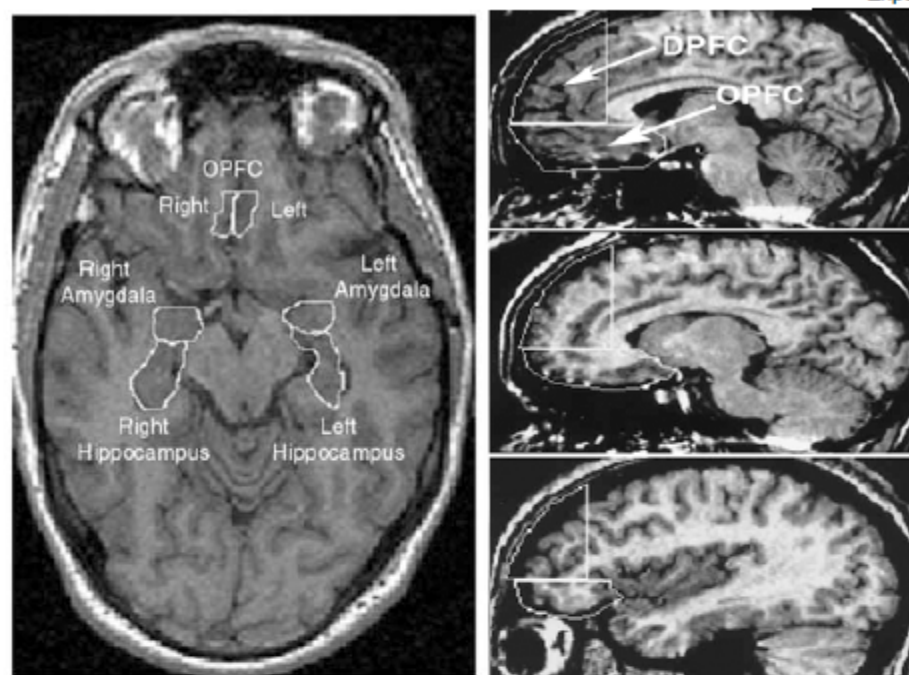


Figura 1. Ilustración creada a partir de una plantilla de RMN (MRIcro; Rorden & Brett, 2000) las regiones de interés del presente estudio y sus límites neuroanatómicos. Izquierda: vista axial de la amígdala, hipocampo y corteza prefrontal orbital (OPFC). Derecha: vista sagital mostrando la delimitación en distintos cortes de las regiones prefrontales dorsal (DPFC) y de OPFC.

- **Parámetros de riesgo de fracturas óseas:** El estudio del riesgo de fracturas se realizará valorando los criterios de la WHO definidos anteriormente y de otra parte midiendo marcadores óseos solubles de formación y de resorción en plasma:

Marcadores bioquímicos:

Entre los marcadores bioquímicos se valorarán:

Marcadores de formación: Medición de ALP específica, P1NP, ALP: resultados serán expresados en función del parámetro a analizar.

Marcadores de resorción: Medición β -CTX: La determinación de la β -CTX se realiza en plasma (EDTA) y los resultados se expresarán en $\mu\text{g/L}$.

PROTOCOLO DE ESTUDIO Y RECOGIDA DE DATOS

Los pacientes serán seleccionados de forma consecutiva para su participación en el estudio en cada uno de los centros (*Servicios de Endocrinología de los Hospitales Universitarios "Clínico San Cecilio" de Granada y "Virgen Macarena", "Virgen del Rocío" y "Hospital de Valme" de Sevilla*) atendiendo a los criterios de inclusión definidos en el apartado anterior. Se les informará de las condiciones del estudio y firmarán el consentimiento informado previamente a su inclusión. El proceso de inclusión se iniciará en enero de 2010 y finalizará en diciembre de 2013. La duración del estudio (3 años) está supeditada a la baja incidencia y prevalencia de esta enfermedad y al porcentaje de curaciones conseguidos en nuestro medio (75-80%).

Para el objeto del estudio los pacientes y controles serán evaluados en dos ocasiones, al inicio (tiempo 0) y a los 24 meses del periodo observacional (tiempo 1). En cualquier caso los pacientes seguirán los criterios de revisiones que cada centro participante tenga protocolizado para la atención de estos pacientes. La atención de los pacientes se ajustará al siguiente esquema:

1ª VISITA (visita inicial): Se realizará la historia clínica protocolizada. Se registrarán las variables



MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente Nº

antropométricas así como la de los parámetros analíticos y morfológicos utilizados para la definición del grupo de estudio. Se rellenarán los consentimientos informados respectivos y se solicitarán las exploraciones objetos del estudio que no estuvieran cumplimentadas.

2ª VISITA (visita de inclusión –tiempo 0-): Se realizará la asignación al grupo “casos” o “controles” en función de los criterios establecidos para la evaluación de las secuelas.

3ª VISITA (visita de seguimiento a los 24 meses –tiempo 1-): Se realizará la valoración clínica del seguimiento. Se registrarán los datos generados de las revisiones ordinarias que puedan tener interés para las conclusiones del estudio. Se solicitarán las exploraciones objetos del estudio que no estuvieran cumplimentadas. Se informará de la finalización de estudio.

4ª VISITA: En esta visita se cumplimentarán todos los datos generados por el estudio y se le dará al paciente cuanta información se haya derivado del mismo.

Todas las variables que se especifican se irán recogiendo en una base de datos diseñada a tal efecto, para su posterior análisis.

La extracción para la determinación de marcadores bioquímicos de disfunción endotelial se realizará en todos los grupos mediante venopunción en la vena antecubital a las 9.00 horas A.M. tras al menos 10 horas de ayuno nocturno, en la misma visita en la que se vaya a realizar el estudio de flujimetria. El estudio de flujimetria se realizará en todos los grupos a las 9.00 h. A.M. tras ayuno nocturno previo en las condiciones descritas en hoja de Anexo 1. Una vez finalizada la exploración se procederá a la extracción de sangre para la determinación de los parámetros bioquímicos.

La realización de las pruebas neurocognitivas comenzarán entre las 0900 y las 1000 de la mañana, sin ayuno previo. Se realizarán el mismo día en que se haga la flujimetria una vez realizada la extracción de sangre para las determinaciones analíticas. Tras la explicación del protocolo y obtención del consentimiento informado se procederá al inicio de la evaluación neurocognitiva. El orden de las pruebas será aleatorio pero forzado a que haya un tiempo estimado fijo entre ciertas condiciones dentro de una prueba. Por ejemplo, el recuerdo diferido de la prueba curva de Luria ha de ser pasados 20 minutos después de la fase de aprendizaje. El tiempo estimado de evaluación será de 100 minutos con un descanso de 10 minutos justo en la mitad de la evaluación.

El intervalo entre el examen por RMN, los exámenes hormonales y la evaluación neurocognitiva no será mayor a dos semanas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Realizaremos estadística descriptiva de las variables del estudio. Para ello usaremos frecuencias absolutas y relativas en el caso de las variables cualitativas. Las variables cuantitativas según sigan o no una distribución normal (tras la aplicación del test de Kolmagrov-Smimov ($n < 50$) se verán resumidas mediante $Mdn \pm SD$ o $P50$ [$P25 - P75$] (mediana, rango intercuartílico) respectivamente. Se realizará una comprobación de los grupos de estudios mediante test χ^2 o el test exacto de Fischer cuando sea necesario para las variables cualitativas. La comparación de las variables cuantitativas según los dos grupos de estudio, se efectuará mediante la t-Student para muestras independientes o U-Mann-Whitney (según sigan o no distribución normal).

Para medir el grado de asociación de las variables explicativas se realizará una regresión logística univariante y multivariante, aportando sus OR y sus intervalos de confianza al 95%. Se realizará una curva ROC, y se dará el área bajo la misma, para establecer su poder discriminante. El nivel de significación estadística, se establecerá en $p < 0.05$. Todos los análisis de los resultados obtenidos se analizarán con el software SPSS 16, de la Unidad de Apoyo a la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

	Expediente N°
<p>Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro</p> <p>Plan de trabajo (Etapas de desarrollo y distribución de tareas de todo el equipo investigador, y las asignaciones previstas para el personal técnico que se solicita. Indicar también el lugar de realización del proyecto) (Máximo 1 página)</p> <p>Número de pacientes a estudiar en el proyecto: 84.</p> <p>Inclusión de pacientes: Desde la consulta especializada de Endocrinología de los Centros participantes y según los criterios referidos en metodología. La selección del grupo pacientes o control será realizada por un Endocrinólogo investigador.</p> <p>El Periodo de inclusión o de reclutamiento se realizará a lo largo de los primeros 12 meses.</p> <p>Recogida de variables: Historia clínica protocolizada, examen físico, presentación del proyecto y del consentimiento informado al paciente (ANEXO 2) y visitas periódicas serán realizadas por Endocrinólogo investigador.</p> <p>La realización de la exploración de la respuesta de GH a hipoglucemia así como su interpretación se realizará en el Laboratorio de pruebas funcionales de cada uno de las Centros participantes por personal entrenado.</p> <p>La exploración de la prueba de Flujiometría lasser y la valoración neurocognitiva se realizará en el Laboratorio de la Unidad de apoyo a la investigación y ensayos clínicos por personal entrenado.</p> <p>Las extracciones de sangre periférica para la determinación de marcadores se realizarán igualmente en la Unidad de apoyo a la investigación y ensayos clínicos. El procesamiento de las muestras y la realización de las distintas técnicas de bioquímica se realizará por técnico perteneciente al Laboratorio de Investigación de Hormonas, supervisado por Bioquímico investigador.</p> <p>El Analisis e interpretación de los resultados se realizará por los miembros del equipo investigador e investigador principal con la colaboración de los estadísticos de la Unidad de Apoyo a la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío..</p> <p>Distribución de tareas.</p> <p>Alfonso Leal Cerro: Selección de pacientes, confección de protocolos, supervisión de pruebas y recogida de datos. Análisis y redacción de trabajos. Supervisión general.</p> <p>Antonio León Justel: Realización y supervisión de exploraciones analíticas, analisis, interpretación de resultados y redacción de trabajos.</p> <p>Alfonso Soto Moreno: Confección de protocolos, recogida de datos, analisis y redacción de trabajos.</p> <p>Federico Relimpio Astolfi: Confección de protocolos, recogida de datos, análisis y redacción de trabajos.</p> <p>Miguel Angel Mangas : Selección, seguimiento de pacientes, recogida de datos y redacción de trabajos.</p> <p>Eva Venegas Moreno : Selección, seguimiento de pacientes, recogida de datos.</p> <p>Elena Torres Vela: Selección, seguimiento de pacientes, recogida de datos y redacción de trabajos.</p> <p>Angel Sendón Pérez: Selección, seguimiento de pacientes, recogida de datos y redacción de trabajos.</p> <p>Juan Ramón Castillo Ferrando: Realización y supervisión de técnica de flujimetría láser. Interpretación de los resultados y redacción de trabajos.</p> <p>José León Carrión: Interpretación de resultados de las exploraciones morfoneurocognitivas y redacción de trabajos.</p> <p>Ainara Madrazo Atuxha: Realización de pruebas neurocognitivas, interpretación de resultados y redacción de trabajos.</p> <p>Teresa Herrera Rey: Realización y supervisión de exploraciones analíticas, analisis, interpretación de resultados.</p> <p>El estudio se realizará en el Servicio de Endocrinología de cada uno de los Hospitales participantes.</p>	



MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente Nº

Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro

Experiencia del equipo investigador sobre el tema

(Máximo 1 página)

El investigador principal y los colaboradores tienen probada experiencia en el estudio de la metodología clínica y analítica para el estudio del Síndrome de Cushing y de sus secuelas. Esta experiencia la avala no sólo su especial dedicación a esta patología a lo largo de muchos años, sino el número de publicaciones nacionales e internacionales, capítulos de libros, cursos o Congresos (ver CV). El investigador principal ha sido además coordinador de grupo del nodo de Sevilla de la red de enfermedades Cardiovasculares 2003-2006 (RECAVA). Actualmente es el Coordinador Nacional del grupo de trabajo de la Sociedad Española de Endocrinología (SEEN) y coordina el Registro Nacional Nacional para esta patología. Coordina además el grupo de trabajo de Neuroendocrinología de la Sociedad Andaluza de Endocrinología (SAEN), teniendo en desarrollo un proyecto de Investigación multicéntrico a nivel de la Comunidad Andaluza en colaboración con el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Córdoba (Prof. J. Castaño) con financiación de la empresa privada (Novartis Oncology) para el estudio de dianas moleculares en tumores hipofisarios. Acaba de finalizar (31 de Marzo 2009) un proyecto FIS (PI05/0716) en el que se ha abordado el estudio de "Factores de riesgo cardiovascular en pacientes con déficit de hormona del crecimiento (GH)". En la actualidad está vigente un proyecto de investigación FIS (PI08/9054) sobre evaluación de la determinación de cortisol en saliva para el cribaje de las situaciones de hipercortisolismo mediante un sistema de recogida y envío de muestras ambulatorio. La solvencia de los coinvestigadores que en su mayoría participan como coinvestigadores en los proyectos referidos anteriormente está avalada de igual forma, además de por su trabajo clínico diario, por sus publicaciones relacionadas con el tema de la investigación. Entre ellas destaca la publicación reciente realizada conjuntamente con el grupo de neuropsicólogos "A clinical profile of memory impairment in humans due to endogenous glucocorticoid excess. *Clinical endocrinology*. 2009; 70(2):192-200".

El IP es Investigador Responsable (IR) del Laboratorio de Endocrinología Experimental del Instituto de Investigación de Biomedicina de Sevilla (IBiS), acreditado por el Instituto de Salud Carlos III. La experiencia investigadora del IP y del resto del equipo investigador, se acreditan en los currícula que se adjuntan.



MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro

Plan de difusión:

- 1.- Relevancia del proyecto en cuanto a su impacto clínico, asistencial y / o desarrollo tecnológico
- 2.- Relevancia del proyecto en cuanto a su impacto bibliométrico

Poco se ha estudiado hasta ahora del papel que puedan jugar los glucocorticoides en el conjunto de todas las variables descritas como factor de riesgo en el mantenimiento de la enfermedad cardiovascular tras la normalización del hipercortisolismo. El SC (hipercortisolismo endógeno) es una enfermedad poco prevalente, pero no así la de las enfermedades que precisan tratamiento con glucocorticoides exógenos como parte de su tratamiento. Bien por sus efectos antiinflamatorios o autoinmunes, cada vez es mayor el espectro de enfermedades que precisan la utilización de glucocorticoides. Los problemas relacionados con el hueso y los efectos metabólicos a corto plazo son bien conocidos. Sus secuelas tardías han sido pero fundamentadas. Desde el punto de vista de los estudios anatomocognitivos, los resultados y conclusiones de estos estudios proporcionarán conocimiento tanto básico como aplicado que servirán para evaluar la efectividad de las distintas decisiones terapéuticas. Este conocimiento sería de gran ayuda en la toma de decisiones en pacientes cuyos trastornos cognitivos persisten una vez curados (rehabilitación neuropsicológica, tratamiento endocrinológico, etc.). Por ello entendemos de una gran repercusión clínica investigar el grado de riesgo vascular, alteraciones neurocognitivas o del metabolismo óseo tras situaciones de hipercortisolismo curado con el fin de plantear en una segunda etapa el estudio de estos posibles riesgos relacionados con las distintas pautas de tratamiento. Establecer el grado de dependencia de las situaciones de hipercortisolismo con respecto a la evolución de sus complicaciones permitirá un mejor control, prevención o tratamiento en. Los resultados del presente proyecto se prevé que se publicarán en revistas internacionales de alto índice de impacto del área de la endocrinología, y/o fisiopatología vascular así como se difundirán los resultados preliminares en Congresos Nacionales e Internacionales relevantes.

Medios disponibles para la realización del proyecto

La Unidad de Gestión de Endocrinología, la Unidad de Hormonas del Servicio de Bioquímica Clínica y la Unidad de Ensayos clínicos de Hospitales Universitarios Virgen del Rocío y de los otros centros participantes dispone de los recursos humanos y técnicos necesarios para la realización del proyecto.

Laboratorio de extracciones y pruebas funcionales de la Unidad de día de la UGEN con personal cualificado y supervisión médica permanente. Centrifuga refrigerada para la obtención de muestras. Congelador a -20 C° y -80 C° para el almacenamiento y conservación de muestras. Ecodoppler láser Perimed Flux System 5000 Sweden, de propiedad compartida con la Unidad de Ensayos Clínicos, ubicado en el laboratorio de exploraciones especiales de dicha Unidad.

Equipos de densitometría por absorción de rayos X Hologic y Equipos de RMN de > 1.5 T.

Software informático en la Unidad de apoyo a la Investigación así como equipos para pasar la realización de las pruebas neuropsicológicas.

Memoria de solicitud del proyecto de investigación: Justificación detallada de la ayuda solicitada

Página 9 de 20



MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

Investigador/a principal: **Alfonso Leal Cerro**

Justificación detallada de la ayuda solicitada

(Máximo 1 página)

Gastos de personal.

El presupuesto que se solicita para la realización del proyecto está dedicado casi en su totalidad a la financiación de personal de apoyo. Los investigadores clínicos con carga asistencial tenemos cada vez mas necesidad de personal colaborador ya que las obligaciones asistenciales impiden una dedicación personal y coordinación estrecha de actividades adicionales al motivo de la investigación. Por esta razón y dado que en la actualidad no disponemos de capacidad de financiación de personal, es por lo que solicitamos la contratación de un técnico de apoyo.

Material fungible.

Excluido el gasto de personal, el resto del presupuesto que se solicita está dedicado casi en su totalidad a la compra de material fungible necesarios para la evaluación de los distintos marcadores y en sí muy costosos.

Otros gastos.

El presupuesto que se solicita en este apartado se justifica en viajes, dietas e inscripciones por la asistencia anual a dos congresos nacionales y uno internacional de miembros del equipo. Además se financiarán los desplazamientos, cada vez más frecuentes, relacionados con la divulgación, colaboración y gestión científica de los datos y finalmente para financiar la compra de manuales y libros especializados así como para la compra de separatas no disponibles por la cobertura bibliográfica institucional.

ANEXO 1

Flujimetria de láser doppler (Perimed Flux system 5000).

Protocolo de realización:

Lugar de realización: Unidad de Ensayos Clínicos.

Se realiza en habitación acondicionada y climatizada que dispone de una cama donde permanecerá el explorando en reposo durante el tiempo de la prueba. Tras 15-30 minutos de reposo, se le conecta un "manguito" de medida de la presión arterial sin insuflar en el brazo y el dispositivo de medida del flujo en el antebrazo a una distancia de 5 cm de la muñeca. El sistema dispone de un medidor de la temperatura cutánea que se activa durante los primeros 2-3 minutos para asegurar una temperatura cutánea normal y estable durante la exploración. A continuación y hasta completar los 15-30 minutos a los que se ha hecho referencia estará activado el sistema de medida de las Unidades de Perfusión en situación basal. Se pasa a la siguiente fase cuando tengamos la seguridad de que el registro representa la situación basal. En la siguiente fase, el manguito de la presión se insufla repentinamente 40 mm por encima de la presión sistólica y permanece así durante 3 minutos. Durante este periodo el monitor del sistema debe mostrar que las unidades de perfusión han caído de forma uniforme hasta casi alcanzar el valor de 0. Al terminar este periodo se desinfla el manguito igualmente de forma súbita y el monitor mostrará un súbito incremento por encima del valor de pre-isquemia. Durante todo este periodo el software del equipo habrá ido recogiendo la perfusión. El explorador indica el punto de pre-isquemia que considera basal y a partir de ahí se calculan automáticamente los siguientes parámetros: flujo basal (UP), incremento del flujo tras el estímulo (valores absolutos y porcentuales), velocidad a la que se produce dicho incremento, y relación entre el área de hiperperfusión tras isquemia y de hipoperfusión durante la isquemia. Finalmente, se esperan otros 15-20 minutos hasta asegurar que el monitor muestra de nuevo el nivel de perfusión basal. Las exploraciones con administración farmacológica tendrán un periodo de lavado de 1 hora (nitroprusiato) y 2 horas (acetil colina) respectivamente.

Memoria de solicitud del proyecto de investigación: Presupuesto solicitado

ANEXO 2 H.U.VIRGEN DEL ROCIO (SEVILLA) H.U VIRGEN MACARENA (SEVILLA) H. VIRGEN DE VALME (SEVILLA) H. SAN CECILIO (GRANADA) SERVICIO ENDOCRINOLOGIA	
DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO"	
Apellidos:..... Nombre:..... Nº Historia clínica..... Fecha:.....	
TITULO DEL PROYECTO: ESTUDIO DE LAS SECUELAS EN PACIENTES CON SINDROME DE CUSHING. Investigador Principal: Alfonso Leal Cerro. Investigadores colaboradores: Antonio León Justel, Alfonso Soto Moreno, Federico Relimpio Astolfi, Miguel Angel Mangas, Eva Venegas Moreno, Elena Torres Vela, Angel Sendon Perez, Juan Ramón Castillo Ferrando, José León Carrión, Ainara Madrazo Atutxa, Teresa Herrera del Rey: LA REGULACIÓN AUTONÓMICA REQUIERE EL CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO DE LOS PARTICIPANTES PARA FORMAR PARTE EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN, DONDE ESTOS PUEDAN DECIDIR SI PARTICIPAN O NO, PARA HACERLO DE UNA FORMA LIBRE Y DE MANERA INFORMADA. EL INVESTIGADOR ESTÁ OBLIGADO A LEER LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE DOCUMENTO Y ASEGURARSE DE QUE USTED, SI DA SU CONSENTIMIENTO, ESTÁ INFORMADO DE LA NATURALEZA DE ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN Y DE CÓMO SERÁ SU PARTICIPACIÓN. FIRMANDO ESTE DOCUMENTO INDICARÁ QUE HA SIDO DEBIDAMENTE INFORMADO Y QUE DA SU CONSENTIMIENTO. · Finalidad: Va a formar parte de un estudio de investigación que tratará de valorar si como consecuencia de la enfermedad que usted padeció tiene complicaciones y en qué grado relacionadas con su enfermedad. En estudios recientes se ha comprobado que estas complicaciones están relacionadas con la enfermedad que padeció o por el contrario tienen un origen diferente. · Descripción del proceso/Procedimiento: La inclusión en el estudio requiere la realización de una serie de determinaciones analíticas en una única extracción encaminadas a valorar el grado de alteraciones analíticas relacionadas con su enfermedad y a la realización de una prueba incruenta (doppler) para valorar el flujo de la	

exploraciones no son cruentas.

· **Riesgos o posibles efectos secundarios:**

La participación en este estudio no conlleva ningún tipo de riesgo. Las molestias las derivadas del pinchazo en vena y colocación de bioconector para la extracción seriada de las muestras de sangre

· **Beneficios:**

Los participantes recibirán un beneficio directo de la participación en el estudio. Dado que son seleccionados de un grupo potencialmente de riesgo de padecer complicaciones relacionadas con su enfermedad inicial, con su participación se les podrá detectar si han mejorado o continua padeciéndolas, lo que permitirá tratarlas adecuadamente.

· **Participación voluntaria:**

Aunque los datos de este estudio pueden ser publicados, se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con los participantes. Los registros de los datos personales y de los resultados estarán a disposición de la Administración como se recoge en la regulación de los estudios de investigación.

DECLARACIONES Y FIRMAS:

· **Declaración del enfermo:**

- He sido informado por el médico de:
 - Las ventajas e inconvenientes del procedimiento arriba indicado
 - Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento
- He comprendido la información recibida y podido formular todas las preguntas que he creído oportunas
- Se me hace entrega de una copia de este documento.
- Estoy de acuerdo en participar en este estudio de investigación.

Nombre..... Firma:

· **Declaración del médico, de que ha informado debidamente al paciente.**

Nombre..... Firma.....

· **Declaración del familiar, persona allegada o representante legal, en su caso, de que han recibido la información por incompetencia del paciente.**

Nombre..... Firma.....

· **Declaración de testigo, en su caso**

Nombre.....Firma.....

10. 2 ANEXO II

MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

Expediente N°

TITULO: RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON OBESIDAD MORBIDA: IMPACTO DE LA PERDIDA DE PESO.		
Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro		
TIPO DE PROYECTO:	INDIVIDUAL <input type="checkbox"/>	COORDINADO <input checked="" type="checkbox"/> MULTICÉNTRICO <input type="checkbox"/>
NOMBRE COORDINADOR/A (COORDINADOS O MULTICÉNTRICOS DE VARIAS SOLICITUDES): Silvia M Arribas		
DURACIÓN:	3 años <input checked="" type="checkbox"/>	
<p>RESUMEN (Objetivos y metodología del proyecto): (Máximo 250 palabras)</p> <p>La causa mas frecuente de muerte en los pacientes obesos es la enfermedad vascular. La obesidad es el componente central y causal del síndrome metabólico, un conjunto de manifestaciones clínicas responsables de la disfunción endotelial que desencadena el proceso de aterosclerosis. El origen de la disfunción endotelial se ha relacionado con la existencia de un aumento sistémico y a nivel endotelial de radicales libres, de la existencia de un entorno pro inflamatorio e inflamatorio sistémicos y endotelial y finalmente con el desarrollo de la lesión ateromatosa y de la inestabilidad de la placa. En este estudio nos proponemos conocer los cambios de un grupo de biomarcadores de lesión vascular en una población de pacientes mórbidos antes y después de la reducción ponderal tras cirugía bariátrica. Para ello compararemos los cambios antes y después de la reducción ponderal de marcadores bioquímicos (perfil lipídico, marcadores de inflamación e insulinoresistencia y de disfunción endotelial), marcadores biofísicos que evalúan la función endotelial in vivo (Holter de PA y flujimetria láser doppler) e in vitro (de la función, mediante miografía de alambre, de las alteraciones mecánicas y estructurales, mediante técnica de miografía de presión y de la estructura vascular, mediante microscopía confocal) y de expresión de adipocitoquinas en tejido adiposo visceral. Se analizarán aquellos biomarcadores de obesidad que mejor correlacionen con los biomarcadores de lesión vascular con el fin de identificar los descriptores que mejor evalúen la lesión vascular y los cambios que puedan producirse tras una intervención terapéutica.</p>		
TITLE: Cardiovascular risks in morbidly obese patients: effects of the weight loss.		
<p>SUMMARY (Objectives and methodology):</p> <p>The most frequent cause of death in obese patients is the cardiovascular disease. Obesity is the causal and central component of metabolic syndrome, a set of clinical manifestations responsible for the endothelial dysfunction that starts the process of atherosclerosis. The origin of the endothelial dysfunction has been associated with the existence of a systemic and endothelial increased free radical levels, with the existence of a systemic and endothelial pro inflammatory and inflammatory environment and with the development of the atheroma injury and plate instability. In this study we aimed at knowing changes in a group of vascular injury biomarkers in a population of morbidly obese patients before and after bariatric surgery. For this purpose, we will study biochemical (lipid profile, inflammation, insulinresistance and endothelial dysfunction markers), biophysical markers that evaluate the endothelial function in vivo (Holter of BP and laser-doppler flowmetry) and in vitro (wire myograph system for the investigation of microvessels), mechanical and structural microvessel alterations (pressure myograph system) and the vascular structure (conphocal microscopy) and expression of adipocytokines in visceral fat tissue. Aiming at identifying correlates that better assess the vascular injury changes that may occur following a therapeutic intervention, we will analyse those biomarkers of obesity that better correlate with the injury vascular biomarkers.</p>		

MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Expediente N°

Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro**Antecedentes y estado actual del tema (Citar las referencias incluidas en el apartado siguiente)**
(Máximo 3 páginas)

El síndrome metabólico que se caracteriza por la coexistencia en un mismo individuo de una serie de biomarcadores que incluyen, hiperinsulinemia, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa/diabetes, hipertrigliceridemia, dislipemia, hipercoagulabilidad e hipertensión arterial, es hoy un problema cada vez mas frecuente en la sociedad y el que mejor correlaciona con el desarrollo de enfermedad cardiovascular. La obesidad es el componente central y causal de este síndrome aunque las causas que lo determinan no han sido totalmente aclaradas (1). El exceso de tejido adiposo (obesidad) es ampliamente reconocido como una de los principales amenazas para la salud en la mayoría de los países del mundo y como un importante factor de riesgo de diabetes tipo 2, de hipertensión arterial y de enfermedades cardiovasculares (2). En un estudio epidemiológico sobre una población de 500.000 adultos entre 50 y 70 años, Adams y cols. (3) han constatado que los individuos con sobrepeso tienen entre un 20 a un 40% de más riesgo de muerte que los individuos con la misma edad e IMC entre 23.5 y 24.9. Más aun, los pacientes obesos tienen de dos a tres veces más riesgo de muerte que los individuos de peso normal. Esta menor expectativa de vida en la población obesa se relaciona con la presencia de enfermedad cardiovascular.

Diferentes mecanismos han sido implicados en la asociación, obesidad y enfermedad cardiovascular. Los dos mas importantes son la inflamación y al aumento del estrés oxidativo responsables de la disfunción endotelial que es el predictor precoz de la enfermedad cardiovascular (4). El tejido adiposo está considerado como un complejo, activo y dinámico órgano endocrino que se encarga no solo de la homeostasis energética sino además de la inmunidad, la inflamación y angiogénesis, a través de la secreción de un gran número de péptidos denominados adipocitokinas. El tejido adiposo expresa además receptores a través de los que responde a señales hormonales y del sistema nervioso central con el fin de regular la ingesta. La acumulación anormal de grasa esta asociada a cambios inflamatorios, que incluyen el reclutamiento de macrófagos y la activación de las células endoteliales promotores de la enfermedad vascular (5). El aumento de la producción de las adipocitokinas y de los ácidos grasos libres, derivados del aumento de la masa grasa, participan en la patogénesis del riesgo cardiovascular a través del proceso pro inflamatorio implicado además en el desarrollo de la resistencia insulínica y de la disfunción endotelial, y por ello de la diabetes y de la arteriosclerosis (6, 7). Las adipocitoquinas producidas por los adipocitos que se relacionan con el riesgo cardiovascular incluyen la leptina, el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), Interleuquina-6, factor de necrosis tumoral (TNF- α), angiotensinogeno, resistina, adiponectina, etc.

El estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de la arteriosclerosis a través de las alteraciones de la función endotelial. La acumulación del tejido adiposo induce un aumento del estrés oxidativo principalmente a través efecto oxidante de los ácidos grasos libres (8,9). El disbalance oxidativo que se produce en la propia grasa corporal a medida que aumenta su volumen (10), es responsable del aumento sistémico de ROS y de la desregulación de la secreción de las adipocitokinas. La obesidad produce un aumento del estrés oxidativo a través de una serie de mecanismos. La sobrealimentación como causa que da lugar a la obesidad produce un aumento de la glucosa y de los ácidos grasos libres. Su transformación en energía se acompaña de un aumento en la producción de radicales libres (estrés oxidativo). Las células musculares y los adipocitos pueden protegerse así mismo de esta situación produciendo una resistencia a la acción de la insulina dirigida a reducir la entrada de glucosa y FFA en las células. Por el contrario, la sobrecarga de glucosa y de FFA en las células β y en el endotelio, dado que son tejidos insulino-independientes, aumenta la actividad oxidativa causando estrés oxidativo que a su vez produce disfunción del

Expediente N°

aun los que lo hacen abordando conjuntamente los aspectos bioquímicos y de la función y estructura vascular con el fin de identificar biomarcadores precoces en obesidad que se asocien con enfermedad cardiovascular.

	Expediente N°
Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro	
<p>Bibliografía más relevante (Máximo 1 página)</p> <p>1.- JF. Keaney, Jr, MG. Larson, RS. Vasan et al. Obesity and Systemic Oxidative Stress: Clinical Correlates of Oxidative Stress in The Framingham Study. <i>Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.</i>, Mar 2003; 23: 434 - 439. 2.- S. Musaad E. N. Haynes. Biomarkers of Obesity and Subsequent Cardiovascular Events. <i>Epidemiol. Rev.</i>, May 10, 2007; (2007) mxm005v1. 3.- The National Heart, Lung, and Blood Institute, and the North American Association for the Study of Obesity. The Practical Guide to the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. Bethesda, Md: National Institutes of Health; October 2000. 4.- G Licata, R Scaglione, LJ Dominguez. Early markers of cardiovascular damage in obese subjects. <i>Nutr Metab Cardiovasc Dis</i>, 1999; 9(2): 78-86. 5.- CA. Curat, A Miranville, C Sengenès et al. From Blood Monocytes to Adipose Tissue-Resident Macrophages: Induction of Diapedesis by Human Mature Adipocytes. <i>Diabetes</i>, 2004; 53: 1285 - 1292. 6.- M Maachi, L Pieroni, E Bruckert, et al. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNFalpha, leptin and IL-6 levels in obese women. <i>Int J Obes Relat Metab Disord</i>, 2004; 28(8): 993-997. 7.- FB. Stentz, GE. Umpierrez, R Cuervo et al. Proinflammatory Cytokines, Markers of Cardiovascular Risks, Oxidative Stress, and Lipid Peroxidation in Patients With Hyperglycemic Crises. <i>Diabetes</i>, 2004; 53: 2079 - 2086. 8.- M Ryden, M Elizalde, V van Harmelen et al. Increased expression of eNOS protein in omental versus subcutaneous adipose tissue in obese human subjects. <i>Int J Obes Relat Metab Disord</i>, 2001; 25(6): 811-815. 9.- P Linscheid, D Seboek, H Zulewski et al. Cytokine-induced metabolic effects in human adipocytes are independent of endogenous nitric oxide. <i>Am J Physiol Endocrinol Metab</i>, June 1, 2006; 290: E1068 - E1077. 10.- S Furukawa, T Fujita, M Shimabukuro et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. <i>J Clin Invest</i> 2004; 114:1752-1761. 11.- A Ceriello E Motz. Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. <i>Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.</i>, May 2004; 24: 816 - 823. 12.- BM Nathan and A Moran. Metabolic complications of obesity in childhood and adolescence: more than just diabetes. <i>Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes</i>, 2008; 15: 21-29. 13.- G Schernthaner JM. Morton. Bariatric Surgery in Patients With Morbid Obesity and Type 2 Diabetes. <i>Diabetes Care</i>, 2008; 31: S297 - S302. 14.- F. Cordido Tratamiento quirúrgico de la obesidad: recomendaciones prácticas basadas en la evidencia. <i>Endocrinología y Nutrición</i>, 2008; 55(Supl 3)1-24. 15.- H Buchwald, Y Avidor, E Braunwald, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. <i>JAMA</i>. 2004;292:1724-1737. 16.- MA Maggard, LR Shugarman, M Suttorp et al. Meta-analysis: surgical treatment of obesity. <i>Ann Intern Med</i>. 2005;142:547-559. 17.- JE. Deanfield, JP. Halcox, TJ. Rabelink. Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance. <i>Circulation</i>, 2007; 115: 1285 - 1295. 18.- M C. Corretti, TJ. Anderson, EJ. Benjamin al. Guidelines for the Ultrasound Assessment of Endothelial-Dependent Flow-Mediated Vasodilation of the Brachial Artery A Report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. <i>J Am Coll Cardiol</i> 2002;39:257-65 19.- EL Schiffrin, D Hayoz. How to assess vascular remodelling in small and medium-sized muscular arteries in humans. <i>J Hypertens</i>, 1997; 15(6): 571-584. 20.- R Joannides, J Bellien, C Thuillez. Clinical methods for the evaluation of endothelial function - a focus on resistance arteries. <i>Fundam Clin Pharmacol</i>, 2006; 20(3): 311-320. 21.- I Harman-Boehm, M Bluher, H Redel et al. Macrophage Infiltration into Omental Versus Subcutaneous Fat across Different Populations: Effect of Regional Adiposity and the Comorbidities of Obesity. <i>J Clin Endocrinol Metab</i> 2007; 92: 2240-2247. 22.- R. MacLaren, W.Cui, S. Simard, K.Cianflone. Influence of obesity and insulin sensitivity on insulin signaling genes in human omental and subcutaneous adipose tissue. <i>J. Lipid Res.</i>, 2008; 49: 308 -323.</p>	

Expediente N°

Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro**Hipótesis**

La causa mas frecuente de muerte en los pacientes obesos es la enfermedad vascular. La obesidad es el componente central y causal del síndrome metabólico, un conjunto de manifestaciones clínicas responsables de la disfunción endotelial que desencadena el proceso de aterosclerosis. El origen de la disfunción endotelial se ha relacionado con la existencia de un aumento sistémico y a nivel endotelial de radicales libres (ROS y RNS), de la existencia de un entorno pro inflamatorio e inflamatorio sistémicos y endotelial y finalmente con el desarrollo de la lesión ateromatosa y de la inestabilidad de la placa.

La hipótesis que planteamos a partir de estos hechos es que la contribución del tipo de grasa corporal y la cantidad comprometen la función y estructura del vaso y que este proceso de lesión vascular es reversible en función de la reducción del peso corporal.

Objetivos

Primer objetivo general:

- 1.- Conocer el grado de de disfunción endotelial en pacientes obesos mórbidos antes y después de la perdida de peso.
- 2.- Conocer la expresión de marcadores de disfunción endotelial en tejido adiposo visceral y de biomarcadores solubles de pacientes obesos mórbidos antes y después de la reducción ponderal.
- 3- Determinar si la obesidad mórbida se asocia con un remodelado de las arterias de resistencia y, en su caso analizar el efecto de la reducción ponderal (objetivo que se realizará de forma coordinada con el grupo de la Universidad Autónoma de Madrid).
- 4-Correlacionar las alteraciones de la función endotelial en las arterias aisladas con la disfunción endotelial estudiada en el paciente mediante Doppler Láser y analizar el efecto de la reducción ponderal.

Segundo objetivo general:

- 1.- Analizar y correlacionar los cambios de cada unos de los parámetros obtenidos con la situación pre y postperdida de peso.
- 2.- Correlacionar los cambios de cada uno de los biomarcadores analizados con los parámetros clínicos que definen el síndrome metabólico (IMC, porcentaje de la reducción ponderal, perímetro de la cintura, parámetros metabólicos, etc.) con la situación pre y postperdida de peso.
- 3.- Analizar los marcadores de obesidad que mejor correlacionen con los marcadores de lesión vascular.

Ajustarse al espacio disponible

Expediente N°

Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro**Metodología (Diseño, sujetos de estudio, variables, recogida y análisis de datos y limitaciones del estudio)**
(Máximo 3 páginas)

Para abordar estos objetivos planteamos estudiar un conjunto de marcadores bioquímicos y biofísicos de la función endotelial. De la gran diversidad de marcadores bioquímicos, el estudio se centrará en algunos de los marcadores más representativos que valoran el grado de estrés oxidativo, de función endotelial, inflamación y de sensibilidad y/o grado de resistencia a la insulina. Como marcadores biofísicos de función endotelial se utilizarán, la toma de presión arterial durante 24 horas, la medición del flujo sanguíneo por vía transdérmica mediante técnica no invasiva de doppler láser y el análisis de los mecanismos implicados en la disfunción endotelial in "vitro" en arterias de resistencia utilizando la miografía de alambre.

Para responder a los objetivos primero y segundo general se ha planteado un estudio cuasiexperimental (preintervención y postintervención sin grupo control), observacional y prospectivo.

SUJETOS DE ESTUDIO:

Para el propósito de este estudio se incluirán:

Grupo 1:

Cien pacientes obesos mórbidos (n=100) a los que se les haya indicado y aceptado la realización de cirugía bariátrica. La selección de esta muestra esta relacionada con la incidencia de cirugía bariátrica actual en nuestro Hospital (45-50 pacientes/año).

Grupo 2:

Cien pacientes obesos mórbidos intervenidos (n=100) constituidos por los mismos pacientes incluidos en el grupo anterior con pérdida de peso tras la cirugía.

2.1. Pacientes en los que se realice la toma de grasa visceral al inicio y al final del periodo experimental. Este grupo estará constituido por aquellos pacientes en los que como consecuencia de alguna complicación de la técnica quirúrgica se realice una segunda intervención durante el periodo de seguimiento del estudio. Asumiendo que en este grupo no se va a poder conseguir la muestra inicial, se ha calculado que con una muestra de 30 sujetos se conseguirían los objetivos planteados

2.2. Pacientes en los que únicamente se realice la evaluación de marcadores solubles y de flujimetría.

La estimación del tamaño de muestra necesario para el desarrollo del proyecto es siempre un problema ya que la expresión para su cálculo dependerá del tipo de medida que se va a realizar (un promedio, una relación, una correlación) y del modelo probabilístico que suponemos describe la distribución de tal medida. A la postre encontramos expresiones que dependen del error tipo I prefijado, de la mínima diferencia significativa, de la potencia de la prueba (que depende del error tipo II) y de la variabilidad de los datos. Además es necesario considerar el tipo de diseño y muestreo utilizado, que condicionará la expresión a utilizar. Pero el escollo fundamental es que han de aventurarse valores que serán los resultados del estudio y se trata de un círculo vicioso sin salida, excepto que apliquemos procedimientos secuenciales. Otra posibilidad es tomar datos de referencia que se encuentren publicados previamente y basarnos en ellos para la estimación muestral. Pero al tratarse nuestro estudio de un proyecto innovador, este protocolo no es posible. Una posibilidad sería realizar la estimación con los resultados parciales obtenidos de los primeros casos de estudio, pero dado que el establecimiento del tamaño muestral en nuestro caso es de 100 pacientes, y por encima de los 30 suele asumirse el postulado de normalidad, pensamos que se trata de un tamaño adecuado para realizar el estudio.

DEFINICION DEL GRUPO DE ESTUDIO:

El grupo de estudio estará constituido por pacientes con obesidad mórbida a los que se les haya indicado cirugía bariátrica como medida terapéutica para perder peso, en función de los criterios

actualmente utilizados en los protocolos de la Unidad de Gestión de Endocrinología (IMC >40, IMC >35) y la existencia de comorbilidades comprometidas por la presencia de la propia obesidad (diabetes, hipertensión, miocardiopatía dilatada o apnea del sueño).

El grupo 2.1 estará constituido por aquellos pacientes en los que como consecuencia de alguna complicación quirúrgica tardía (el 35 % de los pacientes desarrollan complicaciones que exigen una segunda intervención), precisen una cirugía abierta que permitirá la toma de muestra de grasa visceral.

El grupo 2.2 estará constituido por aquellos pacientes a los que únicamente se les pueda realizar la valoración de los marcadores de disfunción endotelial solubles y de flujimetría.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Edad 16-65 años. Este criterio si la indicación de cirugía está indicada no es excluyente para formar parte del estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Existencia de trastorno psiquiátrico grave.
- Periodo de seguimiento menor de 12 meses.
- Ausencia de pérdida ponderal tras la cirugía.
- Embarazo.

Todos los pacientes incluidos en el estudio serán adecuadamente informados sobre las características y finalidad del estudio y firmarán el consentimiento informado previamente a su inclusión. Este estudio cumple con las normas éticas recomendadas por la VII declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (2002) y con las del convenio de Oviedo (1997-2000). (Anexos 1-5).

El estudio se realizará durante un periodo de tres años durante los que en los primeros 24 meses se realizará el periodo de reclutamiento y el estudio basal (precirugía). La evaluación postcirugía deberá realizarse tras un periodo de al menos 12 meses. La evaluación de los resultados se irá realizando anualmente con la muestras reclutadas.

VARIABLES. VARIABLES INDEPENDIENTES:

1.- Sexo. 2.- Edad. 3.- Comorbilidades: Diabetes, hipertensión, hipercolesterolemia, miocardiopatía, apnea de sueño. 4.- Tratamiento farmacológico. 5.- Tiempo de evolución de la enfermedad. 6.- Tipo de intervención. 7.- Tiempo de seguimiento desde la intervención. 8.- Medidas antropométricas: Índice de masa corporal (IMC) medido como relación entre el peso del paciente en kilogramos y la talla al cuadrado. Perímetro de la cintura, medido en el punto de máxima circunferencia. Las variables antropométricas se tomarán con el paciente en ropa ligera y sin zapatos. 9.- Calorimetría indirecta medida mediante la valoración del consumo de oxígeno en campana. 10.- Parámetros de control metabólico: Se realizarán mediante extracción de sangre en la vena ante cubital después de 10 horas de ayuno para la determinación de glucemia, hemoglobina glicosilada, triglicéridos, LDL-colesterol, HDL-colesterol. Estas determinaciones, excepto HbA1c, serán determinadas en suero mediante técnicas de espectrofotometría por métodos comerciales estandarizados. La LDL-colesterol será calculada mediante la fórmula $LDL = CT - HDL - (TG/5)$. La HbA1c se realizará por inmunoturbidimetría en sangre total.

VARIABLES DEPENDIENTES:

1.- PARAMETROS DE CONTROL METABOLICO:

Se realizarán mediante extracción de sangre en vena ante cubital después de 10 horas de ayuno para la determinación de glucemia, hemoglobina glicosilada, triglicéridos, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol. Estas determinaciones excepto HbA1c serán determinadas en suero mediante técnicas de espectrofotometría por métodos comerciales estandarizados en el Hospital. LDL se calculará mediante la fórmula $LDL = CT - HDL - (TG/5)$. La HbA1c se realizará por inmunoturbidimetría en sangre total.

2.- PARAMETROS DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL:

El estudio de la disfunción endotelial se realizará valorando de una parte marcadores solubles de la

disfunción endotelial (marcadores bioquímicos) y de otra mediante la utilización de métodos que evalúan la respuesta endotelial del vaso in "vivo" e in "vitro" (marcadores biofísicos):

2.1. MARCADORES BIOQUÍMICOS:

Dentro de los marcadores solubles de disfunción endotelial se medirán:

- Marcadores de disfunción endotelial:

Medición de PAI-1:

Las concentraciones de PAI-1 se realizarán mediante método cromogénico (Siemens Diagnostic).

- Marcadores de inflamación:

Medición de sTNFR2, adiponectina y IL-6 en suero:

La concentración en suero de sTNFR2, adiponectina y IL-6 será medida con los siguientes ensayos de ELISA: sTNF-RII EASIA™ ELISA kit (Biosource Europe S.A., Belgium), Adiponectin ELISA kit (Linco Research., Missouri, USA), HS IL-6 ELISA (Bender Medsystems, USA). Serán realizadas siguiendo las instrucciones del fabricante. El coeficiente de variación inter- e intra-placa oscila entre el 2 y el 10 % para los tres ensayos.

Medición de PCRus (Proteína C Reactiva ultrasensible):

La PCR ultrasensible se medirá en suero mediante técnica comercial (DADE Behring INC) por inmunonefelometría expresándose los resultados en microg/L.

- Marcadores de estrés oxidativo:

LDL oxidada e isoprostanos:

La actividad de lipoperoxidación se calculará mediante la determinación de LDL oxidada en suero y la determinación de Isoprostanos en orina de 24 horas medidos por EIA (Oxford Biochemical Research, Oxford, Mich).

ADN circulante:

La cuantificación del ADN se realizará usando como marcador el gen de la beta-globina, mediante una curva patrón de concentración conocida de ADN (PCR a tiempo real en LightCycler).

- Marcadores de actividad antioxidante:

Superoxido dismutasa (SOD), glutathion peroxidasa (GSH-Px) y capacidad antioxidante total (TAS): La actividad de las enzimas superoxido dismutasa (SOD), y glutathion peroxidasa (GSH-Px) se realizarán sobre alícuotas de lisado de eritrocitos. El proceso se realizará mediante equipos Bioxytech S.A. (SOD-525, y cGPx-340 respectivamente), Oxis International Inc. (Portland, OR, USA). La capacidad antioxidante total (TAS) se cuantificará de acuerdo con la técnica de Uotila y cols. Free Radic., Biol. Med. 16:581-590, 1994.

2.2. MARCADORES DE LA GRASA:

Estudio de expresión de TNF- α , sTNFR2, IL-6 y adiponectina en tejido adiposo visceral: Inmediatamente a la recepción del tejido, este se lava con PBS frío, y se secciona en fracciones de 100 mg, congelándolo individualmente en nitrógeno líquido. Después se procede a la purificación de ARN total usando el kit: RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen Science, Maryland), siguiendo el protocolo del fabricante. La cantidad y la integridad del ARN se mide con el aparato 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Después se procede a la retrotranscripción con el kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (Applied Biosystems, Foster City, CA). La PCR cuantitativa a tiempo real se realiza con unos ensayos comerciales, que contienen los cebadores y una sonda unida a fluorocromo, para TNF- α , sTNFR2, adiponectin y IL-6. Se utilizará la tecnología TaqMan de Applied Biosystems (2x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Cada reacción TaqMan contendrá 4 μ l de ADNc, correspondiente a 100 ng del ARN total, en un volumen total de la reacción de 25 μ l.

2.3. MARCADORES BIOFÍSICOS:

2.3.1 Holter de PA de 24 horas. Toma de presión arterial ambulatoria cada 20 minutos y durante 24 horas mediante equipo estandarizado.

2.3.2 Valoración de la función endotelial mediante flujimetría láser-Doppler. En condiciones de ayunas (8-12 h antes del estudio) y en temperatura ambiente de 22 °C y con medida de la

temperatura de la piel 32-34° C, sin ingerir sustancias que puedan modificar la vasodilatación mediada por flujo 4-6 h antes de realizar la prueba (caféina, comidas grasas, vit C, tabaco), no haber realizado previamente ejercicio y con supresión de medicación vasoactiva 4 días antes de realizar la prueba siempre que sea posible. La prueba se realizará en la Unidad Apoyo a la investigación y ensayos clínicos Fase I-II, donde está instalado el equipo de flujimetria de láser doppler (Perimed Flux System 500. Sweeden). Se realizarán el estudio de hiperemia reactiva tras isquemia prolongada y tras prueba de vasodilatación con nitroglicerina y vasoconstricción con acetilcolina según procedimiento normalizado de trabajo en la Unidad. Tras un periodo de reposo acostado de 30-60 minutos se le colocan al paciente un “manguito” de medida de la presión arterial sin insuflar en el brazo y el dispositivo láser en el antebrazo derecho, a una distancia de 5 cm de la muñeca. Tras alcanzar una temperatura cutánea normal y estable y completar 15-30 minutos de reposo, se activa el sistema de medida de las Unidades de Perfusión para evaluar la situación basal. Cuando el registro representa la situación basal se insufla el manguito de la presión rápidamente 50 mm por encima de la presión sistólica y permanece así durante 4 minutos. Durante este periodo, el monitor del sistema debe mostrar que las unidades de perfusión han caído de forma uniforme hasta casi alcanzar el valor de 0. Al terminar este periodo, se desinfla el manguito igualmente de forma rápida y el monitor mostrará un súbito incremento por encima del valor de pre-isquemia. Durante todo este periodo, el software habrá ido recogiendo la perfusión. Tras marcar el punto que hemos considerado de pre-isquemia (basal) se calculan automáticamente los siguientes parámetros: flujo basal (UP), incremento del flujo tras el estímulo (valores absolutos y porcentuales), velocidad a la que se produce dicho incremento, y relación entre el área de hiperperfusión tras isquemia y de hipoperfusión durante la isquemia. Los parámetros a analizar serán: PORHmax (PU), PORH max/t1 (PU/s), PORH (%), y relación área PORH/OI.

2.3.3. Estudio de la función vascular mediante miografía de alambre. Este protocolo se ha normalizado con el equipo de la Universidad Autónoma de Madrid, con objeto de poder comparar en obesos mórbidos, no mórbidos y normopeso el grado de disfunción endotelial. Se realizará en un miógrafo de alambre (Danish Myo Technology), según protocolo normalizado en nuestro medio y desarrollado en la etapa de aprendizaje de uno de los investigadores colaboradores durante su estancia con el grupo de la IP del subproyecto de la Universidad Autónoma de Madrid (Conde y cols. Eur J Pharmacol 372:179-86, 1999; Gilham et al., Reprod Sci, 14:43-50, 2007). Para el estudio funcional se obtendrán cuatro segmentos arteriales de las muestras procedentes del tejido adiposo visceral (de 200-400 microm de diámetro y 2 mm de longitud) en los que se insertan a través de su luz dos alambres de acero de 40 microm conectados a un transductor de fuerza que permite determinar la tensión isométrica generada por la arteria. Tras la normalización a 0.9L100, se estudia la función vascular. Se estudiarán las respuestas vasodilatadoras endotelio independiente y endotelio dependientes en segmentos precontraídos con U46619, derivado del tromboxano A2 10-6 M. Las respuestas endotelio-independientes se determinarán mediante curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (NPS) y las endotelio-dependientes mediante curvas dosis respuesta a bradikinina (BK). En experimentos preliminares en arterias omentales hemos observado que el U46619 produce contracción estable y que BK produce vasodilatación. La contribución de los diversos factores vasoactivos endoteliales (NO, PGI2, EDHF) a las relajaciones con BK se determinará mediante preincubación con los inhibidores específicos: Indometacina (inhibidor de la ciclooxigenasa y por tanto de la producción de prostaciclina, PGI2); L-NAME (inhibidor de la sintasa de óxido nítrico) y por tanto de la producción de NO. Para determinar la participación del EDHF se estudiará el efecto relajante de la BK en segmentos precontraídos con bajas concentraciones de KCl. El estrés oxidativo de la pared vascular y su contribución a la disfunción endotelial se determinará mediante las respuestas a BK en presencia y ausencia de fármacos relacionados con los sistemas de producción y eliminación de radicales libres de oxígeno (ROS): Superóxido dismutasa (eliminación de O₂⁻), Catalasa (paso de O₂ a H₂O₂) y NAD(P) (sustrato de la NADPH oxidasa).

2.3.4 Estudio de las alteraciones mecánicas y estructurales.

Durante los primeros meses del proyecto se prevé realizar un estudio de la viabilidad de los segmentos arteriales obtenidos en los pacientes intervenidos guardados a 4° C a lo largo del tiempo, con objeto de determinar el tiempo máximo de envío de muestras desde Sevilla para el estudio de la mecánica pasiva en pacientes con obesidad mórbida. Este estudio se realizará mediante la técnica de miografía de presión según el protocolo descrito por el grupo de la Universidad Autónoma de Madrid (González y cols. American Journal of Physiology. 291:H804-H812, 2006). Posteriormente los segmentos arteriales se fijarán con paraformaldehído al 4% para el estudio de microscopía confocal de fluorescencia.

2.3.5 Estudio de la estructura vascular mediante microscopia confocal. El estudio detallado de la organización celular y de la matriz extracelular en arterias presurizadas intactas se determinará mediante las técnicas desarrolladas por el grupo de la Universidad Autónoma de Madrid combinando microscopía confocal y sistemas de análisis de imagen por ordenador (Arribas y cols. J. Physiol. 584:5-9, 2007). Asimismo se estudiarán en la propia pared vascular mediante inmunohistoquímica algunos marcadores de interés que se obtengan del estudio de biomarcadores bioquímicos.

3.- VARIABLES DE INSULINO RESISTENCIA:

La insulino resistencia se valorará mediante el índice IR-HOMA calculado como glucosa (mmol/L)x insulina (mcU/ml)/22.5. La determinación de insulina se practicará por electroquimioluminiscencia mediante técnica comercial (Roche diagnostic) expresándose los resultados en mcU/ml.

4.- MARCADORES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA:

Con el fin de valorar los resultados en función de la existencia o no de un factor genético predisponente, se analizará un polimorfismo del gen del receptor beta3-adrenérgico predisponente para desarrollo de obesidad mediante PCR a tiempo real en LightCycler (Roche Diagnostics).

PROTOCOLO DE ESTUDIO Y RECOGIDA DE DATOS:

Los pacientes serán seleccionados de la consulta especializada de Obesidad del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Una vez establecida la indicación de cirugía se solicitará su participación en el estudio. Será necesario el reconocimiento expreso de su participación mediante firma del propio paciente y de un familiar de los consentimientos informados (Anexos 1-5). El estudio de los marcadores bioquímicos se realizará al inicio y al final del estudio en fechas que coincidan con las extracciones de preintervención (preanestesia). El estudio de los marcadores biofísicos, del Holter de PA y de la flujimetria se realizarán en régimen ambulatorio, previos a la fecha de la intervención. Si entre la fecha de ingreso en el Hospital y la intervención mediará más de 24 horas la flujimetria se realizará la mañana previa a la intervención. La extracción de las muestras de grasa se realizarán siempre de la misma zona (grasa epiploica) durante el acto quirúrgico antes del inicio de la técnica quirúrgica. Entre la realización del estudio basal al inicio y la de postcirugía, deberán pasar no menos de 12 meses. La toma de la segunda muestra de grasa epiploica solo se justificará si hay una cirugía abierta tras la primera intervención. El seguimiento de los pacientes se ajustará al esquema de atención establecido para esta patología por la Unidad de Endocrinología y de Cirugía Endocrina del Hospital. Todas las variables que se especifican para el estudio se recogerán en una base de datos diseñada "ad hoc" que será colgada en la Intranet y gestionada mediante clave de acceso personal para cada uno de los integrantes en el estudio. Con el fin de garantizar el análisis ciego, las muestras que se remitan a la Universidad Autónoma de Madrid para el estudio de la mecánica y estructura de los vasos, serán codificadas con el fin de que se asegure la no identidad de las mismas.

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos serán codificados, introducidos y analizados en el programa SPSS 15.0 para Windows o superior. Para la descripción de las variables se utilizará la estadística descriptiva. La normalidad de la distribución de la variable bajo consideración se contrastará mediante la prueba de Shpiro-Wilks y

el ensayo de Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors. Los ensayos de significación relativos a la comparación de los valores de las variables se realizarán, dependiendo que su distribución sea normal o no. En el primer caso se emplearán ensayos paramétricos (prueba de la t de Student y ANOVA) y en el segundo, no paramétricos (Mann-Witney o Wilcoxon). De igual modo, para evaluar el grado de asociación de las diferentes variables cuantitativas se usará el coeficiente de correlación de Pearson si las distribuciones son normales o el de Spearman en caso contrario. Se realizarán los correspondientes análisis de regresión lineal múltiple para el control de las posibles variables de confusión. Se considerará significativa una $p > 0.05$.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO:

Las limitaciones del estudio podrán venir de una parte, de la obtención de la grasa visceral tras la pérdida de peso en el caso en el que la incidencia de cirugía abierta para corregir complicaciones quirúrgicas sea menor que la estimada por el cálculo del tamaño muestral realizado. De otra parte, las limitaciones podrían también estar relacionadas con el estudio de la viabilidad de los vasos que se envíen a la Universidad Autónoma de Madrid, si no es la esperada. En este caso el análisis de los datos se correlacionaría solo con los resultados del estudio de la estructura vascular.

JUSTIFICACION DEL ESTUDIO COORDINADO.

La coordinación entre los subproyectos del H. Virgen del Rocío y el de la Universidad Autónoma de Madrid está justificada en base a la existencia de una colaboración entre ambos grupos, ya que el investigador asociado al proyecto que desarrolla la metodología del miógrafo hizo su etapa de aprendizaje de la metodología en el grupo de la Universidad Autónoma de Madrid (Dra. Arribas) y actualmente colabora con este grupo en la realización de un proyecto FIS previo donde estamos estudiando la morfometría de arterias de resistencia de pacientes con déficit de hormona del crecimiento (GH) y los cambios tras tratamiento con GH. Además, la justificación del estudio coordinado que se propone está fundamentalmente soportada en base a la utilización de objetivos y metodologías comunes aunque con un perfil poblacional diferente y complementario: determinar en pacientes obesos la existencia de disfunción endotelial y/o remodelado vascular en las arterias de resistencia subcutáneas y su relación con el estado de inflamación y de estrés oxidativo de paciente obesos no mórbidos. La justificación de dicha coordinación viene además determinada porque en la misma forma que ellos asumirán el estudio de la mecánica y estructura de los vasos de la que tienen una gran experiencia nosotros asumiríamos la realización de los marcadores solubles de su subproyecto. El hecho de que el grupo investigador desarrolle su actividad en el entorno hospitalario (Instituto de Biomedicina de Sevilla-IBiS/Hospital Univ. Virgen del Rocío), así como la colaboración de la Dra. Arriba (Universidad autónoma de Madrid), como IP del proyecto coordinado y el Dr. José María Moreno del grupo del Dr. Fernández-Real (Servicio de Endocrinología del Hospital Josep Trueta de Girona), para el uso de esta aproximación diagnóstica sobre el valor predictivo de biomarcadores de riesgo cardiovascular en pacientes con distinto grado de obesidad, fortalecen las posibilidades de traslación a la práctica clínica de la investigación biomédica conjunta propuesta.

Expediente N°

Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro

Plan de trabajo (Etapas de desarrollo y distribución de tareas de todo el equipo investigador, y las asignaciones previstas para el personal técnico que se solicita. Indicar también el lugar de realización del proyecto)

(Máximo 1 página)

Número y selección de pacientes a estudiar en el proyecto: 100 pacientes obesos mórbidos intervenidos por técnicas de cirugía bariátrica. Los pacientes serán seleccionados en la consulta de obesidad donde serán seguidos según los protocolos asistenciales. La selección y seguimiento de los pacientes será realizada por dos endocrinólogos del equipo investigador.

Periodo de inclusión: El periodo de inclusión constará de 24 meses, durante los cuales se asegure un tiempo de seguimiento tras la primera y la segunda valoración de al menos 12 meses. La finalización de los casos de estudio terminará dos meses antes de la finalización del proyecto. Las actividades de selección del paciente, recogida de la historia clínica, presentación del proyecto y de los consentimientos informados al paciente (ANEXOS 1-5) y visitas periódicas serán realizadas por dos endocrinólogos de la consulta de obesidad coinvestigadores del proyecto.

Recogida de variables: En la Unidad de Gestión de Endocrinología y Nutrición se gestiona la Historia Clínica informatizada. A esta base preexistente se le añadirán todas aquellas variables específicas del proyecto con capacidad de gestión informática sólo por los miembros del equipo investigador por clave de acceso personal. Las extracciones de sangre periférica y procesamiento de las muestras serán realizados en el área de la Unidad de Ensayos clínicos del Hospital por un técnico capacitado en el manejo de muestras para estudios experimentales. La colocación y retirada de Holter de PA y la realización de flujimetría se llevarán a cabo en la Unidad de apoyo a la investigación por personal experto de dicha Unidad. La obtención de la grasa tanto en el estudio inicial como tras la pérdida de peso será realizada por cirujano experto integrante del equipo investigador y procesadas por el responsable del grupo de la ejecución de los experimentos in vitro.

Análisis de los datos: El análisis e interpretación de los datos se realizará anualmente con la muestra recopilada por un experto en análisis quimiométricos miembro del equipo investigador.

Distribución de tareas:

Alfonso Leal Cerro: Confección de protocolos, supervisión de pruebas y recogida de datos. Análisis y redacción de trabajos. Supervisión general.

Pedro Pablo García Luna y Jose Luis Pereira Cunill: Selección y seguimiento de pacientes. Confección de protocolos, recogida de datos, análisis y redacción de trabajos.

Juan Manuel Martos Martínez y Marina Perez Andres: Realización de técnicas quirúrgica, seguimiento de pacientes y obtención de la muestra de grasa.

Luís Jiménez Jiménez Antonio León Justel: Realización y supervisión de exploraciones analíticas, interpretación de resultados y redacción de trabajos.

Juan Ramón Castillo Ferrando: Realización y supervisión de técnica de flujimetría láser y Holter de PA. Interpretación de los resultados y redacción de trabajos.

Alejandro Caro Pérez: Obtención de vasos, realización del protocolo de tonometría y preparación de muestras para su envío al grupo de Madrid.

Gustavo González González: Análisis estadístico de los resultados y redacción de trabajos.

El Dr José María Moreno será el encargado de cuantificar la concentración de adipocitoquinas en plasma y del análisis de expresión de estas citoquinas en tejido adiposo, utilizando la metodología arriba descrita. El estudio se realizará en el Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

La parte experimental se realizará en el Laboratorio de Endocrinología Experimental del Instituto de investigación de biomedicina de Sevilla (IBiS).

Expediente N°

Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro**Experiencia del equipo investigador sobre el tema**

(Máximo 1 página)

Los distintos componentes que participan como investigadores en el proyecto tienen experiencia acreditada en el manejo clínico del paciente obeso, así como en la realización de las técnicas de cirugía bariátrica. La incidencia de cirugía de la obesidad morbida en nuestro Hospital en la actualidad es de 45-50 pacientes año. Igualmente poseen amplia experiencia en investigación clínica. El laboratorio de Endocrinología cuenta con el personal, la instrumentación y la experiencia necesarias para la realización de las técnicas especificadas. La unidad de apoyo a la investigación y ensayos clínicos donde se van a realizar las extracciones sanguíneas, colocación y retirada del Holter de PA y exploraciones de doppler laser cuenta con la dotación de personal e instrumentación necesarias para la realización de dichas técnica. Finalmente el Laboratorio de Endocrinología Experimental del IBiS donde se van a realizar los experimentos "ex vivo" cuenta con personal, instrumentación y experiencia contrastada en investigación básica. En el 2009 sus instalaciones estarán ubicadas dentro del Complejo del Instituto de Investigación cuya dotación de personal de apoyo, de medios y equipos ha sido recientemente acreditada por el Instituto de Salud Carlos III. El investigador principal tiene un proyecto del FIS como IP, aun vigente PI050716 (FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON DEFICIT DE HORMONA DEL CRECIMIENTO (GH) en el que se abordan de forma prospectiva el estudio de los factores de riesgo cardiovascular relacionados con el deficit de hormona del crecimiento y tras tratamiento sustitutivo con GH durante 12 meses, en el que se utiliza la misma metodología de estudio (estudio de marcadores solubles de disfunción endotelial, flujimetria y estudio de vasos de resistencia en tejido adiposo subcutáneo). Aunque estamos en fase de análisis preliminar de los resultados, se han generado 3 abstract de congresos (2 Nacional y 1 Internacional y se ha remitido un trabajo a una revista internacional que está en fase de evaluación). (Efectos del tratamiento con GH sobre las alteraciones de la función endotelial en pacientes con déficit de GH del adulto. Congreso SEEN. Mayo 2008; Valoración del flujo capilar mediante caudalimetria en pacientes con deficit de hormona del crecimiento (GH) y en controles sanos: estimación de los efectos del tratamiento con GH. Congreso SEEN, Mayo 2008; Oxidative stress in patients with Cushing's syndrome. Endocrine Society's 90th Annual Meeting, San Francisco. June 2008.)

El IP es Investigador Responsable (IR) del Laboratorio de Endocrinología Experimental del Instituto de Investigación de Biomedicina de Sevilla (IBiS), recientemente acreditado por el Instituto de Salud Carlos III. La experiencia investigadora del IP y del resto del equipo investigador, incluidos los investigadores del subgrupo de la Universidad Autonoma de Madrid, se acreditan en los curricula que se adjuntan y en los remitidos por dicho grupo.

Expediente N°

Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro

Plan de difusión:

1.- Relevancia del proyecto en cuanto a su impacto clínico, asistencial y / o desarrollo tecnológico

2.- Relevancia del proyecto en cuanto a su impacto bibliométrico

La enfermedad cardiovascular es sin duda la causa de muerte más importante en la población. Las causas por las que se desarrolla esta enfermedad no son totalmente conocidas. Asumimos sin embargo que hay circunstancias desencadenantes como la obesidad que facilitan su desarrollo y en la que se han identificado factores de riesgo como la hiperlipemia, insulino resistencia, marcadores de inflamación y de disfunción endotelial cuyo utilidad clínica para muchos de ellos están cuestionados. Sin embargo, existe muy poca información sobre la correlación de estos biomarcadores con las características secretoras de la grasa abdominal y con la función y estructura de las arterias de resistencia. Por tanto la relevancia del proyecto desde el punto de vista clínico y asistencial estará en conocer y seleccionar aquel/aquellos biomarcadores que mejor correlacionen con las anomalías a nivel del tejido adiposo y vascular y sean a su vez los más precoces en su información. Desde el punto de vista de desarrollo tecnológico, la relevancia del proyecto vendrá determinada por la posibilidad de valorar la repercusión sobre estos biomarcadores de las medidas encaminadas a inducir cambios en el estilo de vida y/o peso en la población obesa (dietas, actividad física, aceite de oliva, etc), así como a valorar el efecto de fármacos y/o sustancias antioxidantes in vitro y in vivo. La obtención de los resultados esperados permitirán abordar con mayores garantías de éxito la extrapolación del diagnóstico del riesgo cardiovascular en pacientes obesos.

Los resultados del presente proyecto se prevé que se publicarán en revistas internacionales de alto índice de impacto del área de la endocrinología, obesidad y/o fisiopatología vascular así como difundir los resultados preliminares en Congresos Nacionales e Internacionales relevantes.

Medios disponibles para la realización del proyecto

Consulta externa especializada en Obesidad (C-3) y (Cirugía endocrina) ubicadas en el área de consultas externas de la Unidad de Gestión de Endocrinología y Nutrición y de Cirugía (Centro de Diagnóstico y Tratamiento) del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Habitación termostatzada para la realización de los estudios de flujimetría con ecodoppler láser, (Ecodoppler laser Perimed Flux System 5000) área de extracciones con centrifuga refrigerada en la Unidad de de apoyo a la investigación y de Ensayos clínicos y clínica situada en la primera planta ala Norte del Hospital.

Miógrafo de cuatro canales (Danish Myotechnology, Aarhus, Denmark), ubicado en el laboratorio de Endocrinología experimental.

MagNA Pure para la extracción de ADN y PCR.

A partir de 2009 se dispondra además de la dotación de medios, personal de apoyo y equipos del IBiS.

Ajustarse al espacio disponible

Expediente N°

Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro

Justificación detallada de la ayuda solicitada

(Máximo 1 página)

Gastos de personal

Debido a la complejidad del proyecto, la financiación solicitada en el apartado de personal va dirigida a la contratación de un técnico de apoyo ya que es necesaria la coordinación entre los distintos miembros del equipo investigador, en su mayoría clínicos con una actividad asistencial muy cargada, la recogida, seguimiento y envío de muestras, así como del proceso de recogida de los datos. La labor de un técnico con dedicación exclusiva al proyecto garantizará el seguimiento constante de la situación del proyecto por parte del IP responsable.

Material inventariable

Material de microcirugía para la disección de microvasos del tejido adiposo (tijeras y pinzas de precisión, etc.)


Material fungible

El presupuesto que se solicita para la realización del proyecto está dedicado casi en su totalidad a la compra de material fungible necesarios para la evaluación de los distintos marcadores en sí muy costosos.

Otros gastos

El presupuesto que se solicita en este apartado se justifica en base a criterios de reparación y mantenimiento de equipos del laboratorio, para viajes, dietas e inscripciones por la asistencia anual a dos congresos nacionales y uno internacional de miembros del equipo. Además se financiarán los desplazamientos, cada vez más frecuentes, relacionados con la divulgación, colaboración y gestión científica de los datos y finalmente para gastos de mensajería necesarios para el envío de las muestras y para financiar la compra de manuales y libros especializados así como para la compra de separatas no disponibles por la cobertura bibliográfica institucional.

		Expediente N°
Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro		
PRESUPUESTO SOLICITADO		
1. Gastos de personal	Euros	
Primera anualidad	16,000.00	
Segunda anualidad	16,000.00	
Tercera anualidad	16,500.00	
SUBTOTAL		49,500.00
2. Gastos de ejecución		
a) Adquisición de bienes y contratación de servicios (Inventariable, fungible y otros gastos) (Inventariable, fungible y otros gastos): Material de microcirugía para la disección de microvasos del tejido adiposo (tijeras y pinzas de precisión, etc. Marcadores de disfunción endotelial e inflamación. Marcadores de Insulino resistencia. ADN y polimorfismo del gen beta3-adrenérgico. Costos de ejecución de flujimetría doppler láser. Costos de realización de la tonometría (miógrafo). Otros gastos: Gastos de mensajería (envío de muestras) y financiación de la compra de manuales y libros especializados, etc.	3,000.00 44,600.00 5,318.75 7,153.40 7,850.00 15,000.00 6,000.00	
SUBTOTAL		88,922.15
b) Viajes y dietas Primer año: Congreso Nacional Congreso Internacional Segundo año: Asistencia a Congreso Nacional Asistencia a Congreso Internacional. Tercer año: Asistencia a Congreso Nacional Asistencia a Congreso Internacional.	1,500.00 3,000.00 1,500.00 3,000.00 1,500.00 3,000.00	
SUBTOTAL		13,500.00
SUBTOTAL GASTOS EJECUCIÓN		102,422.15
TOTAL AYUDA SOLICITADA		151,922.15

	
Investigador/a principal: Alfonso Leal Cerro	
MEMORIA DE SOLICITUD DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN ANEXOS	
	Expediente N°
<p style="text-align: center;">Anexo 1a: DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</p> <p style="text-align: center;">HH.UU.VIRGEN DEL ROCIO</p> <p>UNIDAD DE GESTION DE ENDOCRINOLOGIA y NUTRICION</p> <p>Apellidos:.....</p> <p>Nombre:.....</p> <p>Nº Historia clínica.....Fecha:.....</p> <p>TITULO DEL PROYECTO: FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES OBESIDAD MORBIDA: IMPACTO DE LA PERDIDA DE PESO.</p> <p>Investigador Principal: Alfonso Leal Cerro. Investigadores colaboradores: Pedro Pablo García Luna, José Luís Pereira Cunill, Juan Manuel Martos Martínez, Marina Pérez Andrés, Luís Jiménez Jiménez, Antonio León Justel, Juan Ramón Castillo Ferrando, Alejandro Caro Pérez, Gustavo González González, José María Moreno Navarrete.</p> <p>LA REGULACIÓN ACTUAL REQUIERE EL CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO DE LOS PARTICIPANTES PARA FORMAR PARTE EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN, DONDE ESTOS PUEDAN DECIDIR SI PARTICIPAN O NO, PARA HACERLO DE UNA FORMA LIBRE Y DE MANERA INFORMADA. EL INVESTIGADOR ESTÁ OBLIGADO A LEER LA INFORMACIÓN CONTENIDA EN ESTE DOCUMENTO Y ASEGURARSE DE QUE USTED, SI DA SU CONSENTIMIENTO, ESTÁ INFORMADO DE LA NATURALEZA DE ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN Y DE CÓMO SERÁ SU PARTICIPACIÓN. FIRMANDO ESTE DOCUMENTO INDICARÁ QUE HA SIDO DEBIDAMENTE INFORMADO Y QUE DA SU CONSENTIMIENTO.</p>	

Hoja de Información al paciente:

La siguiente información describe el estudio a realizar y las consideraciones más importantes acerca del riesgo cardiovascular de la obesidad y del beneficio que se pueda derivar tras la pérdida de peso. Por favor léalo cuidadosamente y no dude en preguntar a su médico si no entiende algún punto.

La obesidad mórbida es una enfermedad que comporta un importante riesgo para su salud. Por esta razón y ante el fracaso de múltiples alternativas para perder peso se le ha planteado el tratamiento quirúrgico de la misma. Dentro de los factores de riesgo asociados a la obesidad (diabetes, hiperlipidemia, hipertensión, enfermedad cardiovascular, etc.) está como el más importante el relacionado con su salud cardiovascular. La pérdida de peso mejora la evolución de la mayoría de ellos.

El objetivo de este estudio es aportar información sobre las posibles modificaciones que la pérdida de peso presenta sobre cada uno de los marcadores de riesgo cardiovascular, con el fin de valorar el beneficio de la pérdida de peso sobre dicho aspecto de su enfermedad.

Su médico le revisa habitualmente en la consulta porque usted padece una Obesidad mórbida con indicación de cirugía. Por este motivo usted ha sido seleccionado, para participar en este estudio. La realización de nuestro estudio no supondrá para usted ninguna actuación más de las que efectúa su médico para el control de su enfermedad. Para el estudio necesitaremos la extracción de una muestra de sangre, la toma de la Presión arterial 24 horas, la realización de una prueba donde mediremos el flujo sanguíneo en el antebrazo en situación de reposo y la recogida de una pequeña muestra de grasa abdominal de unos 10 grs que se obtendrá coincidiendo con la intervención híncalo y si precisa una segunda intervención al menos 12 meses después de la intervención inicial.

Los procedimientos del estudio consisten en el análisis de la muestra de sangre donde se medirán una serie de análisis no habituales, la toma de presión arterial durante 24 horas y la de flujimetría, cuyos procedimientos son incruentos y no representan ningún tipo de riesgo adicional. De igual forma se realizará una toma de grasa abdominal durante la intervención que de igual forma no representa ningún tipo de agresión adicional ya que se realizara durante la misma bajo anestesia general, para el estudio in vitro de la respuesta y morfología de los vasos y para el estudio de la composición de la grasa abdominal. A todos los participantes en el estudio se les pide su aceptación por escrito.

El Dr. _____ investigador responsable/colaborador del estudio está a su disposición en caso de que tuviera alguna duda, pregunta o problema.

La confidencialidad de los datos relacionados con este estudio será respetada, sólo tendrán acceso a ellos el investigador y el médico encargado de su control.

La participación es voluntaria y en cualquier momento puede retirarse del estudio sin que esto altere la relación con su médico ni produzca perjuicio sobre su seguimiento. Si esta información le parece suficiente y está de acuerdo en participar en el estudio por favor firme el formulario de consentimiento por escrito. MUCHAS GRACIAS.

ANEXO 1 b. CONSENTIMIENTO INFORMADO

--	--

ESTUDIO: Riesgo cardiovascular en pacientes con obesidad mórbida: impacto de la pérdida de peso.

Por favor marque la contestación apropiada:

¿Ha leído la hoja informativa de consentimiento que se le ha entregado? Si No
 ¿Ha recibido suficiente información sobre el estudio y ha tenido la oportunidad de preguntar sobre el mismo obteniendo respuestas satisfactorias a las preguntas efectuadas? Si No

¿Con quién ha hablado? Dr _____

¿Está de acuerdo en que su participación es voluntaria y que puede retirarse del estudio:
 ¿En cualquier momento? ¿Sin tener que dar explicaciones? ¿Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos? Si No

¿Está de acuerdo en que su historial médico sea examinado por personal autorizado manteniendo la confidencialidad de su identidad y que esta no sea divulgada? Si No

He contestado SI a todas las preguntas arriba indicadas y estoy de acuerdo en participar libremente en el estudio.

Firma del participante: _____ Fecha: ____/____/____
 (padre o representante legal en caso de ser menor de edad) d m a

Nombre del participante en mayúsculas: _____

Firma del testigo: _____ Fecha: ____/____/____
 d m a

Nombre del testigo en mayúsculas: _____

UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE ENDOCRINOLOGIA Y NUTRICIÓN

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA el análisis de ADN

El paciente D. _____ padece una Obesidad extrema por la que va a ser intervenido quirúrgicamente mediante Cirugía Bariátrica.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) se encuentra situado en el interior de todas las células con núcleo del organismo y contiene la información genética. En personas sanas existen pequeñas cantidades de este ADN que se encuentran circulando libremente en el torrente sanguíneo. Dichos valores de ADN circulante se elevan mucho en los pacientes graves, en especial, en los que tienen una infección generalizada y en las situaciones de Obesidad mórbida.

Con el presente escrito le solicitamos permiso para incluirle en un proyecto de investigación que tiene por objeto evaluar si este ADN circulante es una determinación que ayuda a valorar los riesgos relacionados con su obesidad y especialmente a predecir el beneficio de la pérdida de peso, mejor que otras determinaciones de las que ya disponemos.

Para ello, se procederá la extracción de 6 cc de sangre lo cual se realizará solo en dos ocasiones: basal y tras la pérdida de peso conseguida al menos un año después de la intervención. La cuantía de esta extracción no tiene ningún efecto adverso ni perjudica en absoluto el curso de la enfermedad. De igual modo, tampoco precisa una nueva extracción de sangre ya que la sangre se obtiene al mismo tiempo que el de otras exploraciones analíticas necesarias para valorar la evolución de su enfermedad. De igual modo se obtendrá ADN de la muestra de grasa que se extraiga durante la intervención para la valoración de la expresión de genes a través de técnicas que analizan parte de la estructura del ADN. No se realizarán ninguna otra prueba diagnóstica derivadas del presente estudio de investigación excepto las especificadas en el anexo de información al paciente (Anexo 2ª y 2b).

Los datos de este estudio serán conocidos con posterioridad y en ningún caso modificaran el diagnóstico y tratamiento del proceso actual. Obviamente, si no diera su consentimiento, se realizará exactamente el mismo tratamiento y en absoluto se modificará la actitud a seguir. Las muestras que se obtengan tienen un valor únicamente científico. No se podrán utilizar para desarrollar productos comerciales con valor terapéutico. Tampoco serán utilizadas para otro estudio que no esté relacionado directamente con este, sobre el cual he sido informado. Para garantizar la máxima confidencialidad ninguna información constará en la historia clínica. Esta será codificada y protegida en un archivo por los investigadores.

Si tiene alguna duda no dude en preguntar antes de firmar este escrito.

El Dr. _____ me ha informado adecuadamente y he comprendido el objeto de este estudio autorizando la participación en el mismo en calidad de paciente/familiar (_____, parentesco).

Fdo. Dr. _____
DNI. _____

Fdo. Dr. _____
DNI. _____

Fecha _____

UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE ENDOCRINOLOGÍA Y NUTRICIÓN

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Yo, D..... autorizo a la Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío de Sevilla a obtener y conservar una muestra biológica mía de grasa ABDOMINAL que se obtendrá durante la intervención de cirugía bariátrica y de cualquier otra intervención que se derive de la anterior.

Previamente a conceder esta autorización he sido informado/a sobre los siguientes aspectos de este consentimiento:

- 1.- He recibido información sobre las razones por la que me solicitan la muestra biológica.
- 2.- La muestra obtenida podrá utilizarse para investigaciones biomédicas relacionadas o no con la enfermedad o proceso que padezco, siempre que el fin último sea la mejora de la salud.
- 3.- Los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío garantizarán la más estricta confidencialidad de los datos facilitados en cumplimiento de lo dispuesto en la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal. En el caso en que la muestra biológica sea cedida a otro grupo fuera de nuestro hospital para realización de investigaciones, también se mantendrá la confidencialidad de mis datos.
- 4.- En cualquier momento podré ejercitar los derechos de acceso, rectificación cancelación o revocación de este consentimiento sin que ello conlleve una merma en la asistencia que recibo en los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. La custodia de este documento se realizará por parte de la Unidad Clínica de Endocrinología y Nutrición de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío.
- 5.- La cesión de la muestra biológica para fines de investigación se realiza de modo altruista y voluntario, renunciando a recibir ningún tipo de compensación por la misma.

Sevilla.....de..... de 200....

Firma: DNI:

REFERENCIA DE LA MUESTRA

Dr/a.....

Hospital/Servicio/Unidad.....

ANEXO 7.

UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE ENDOCRINOLOGIA Y NUTRICIÓN

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA REALIZACIÓN DEL ESTUDIO DE FUNCIÓN ENDOTELIAL POR FLUJIMETRÍA LASER-DOPPLER

CONSENTIMIENTO INFORMADO

¿Qué es la función endotelial?:

Es un sistema que permite conocer el grado de daño que existe en las arterias y/o la posibilidad de que éste se produzca o se agrave en los próximos años.

¿En que consiste dicho procedimiento?:

Mediante un procedimiento no invasivo se mide con una sonda Láser-Doppler pegada a su piel el grado de perfusión ("Riego sanguíneo") a nivel microvascular, antes, durante y después de hinchar un manguito como los que se utilizan para tomar la presión arterial, en el brazo y durante 4 minutos.

¿Qué molestias puede sentir?

Al hinchar el manguito notará la misma sensación de presión en el brazo que cuando se le toma la presión arterial. Posteriormente, y habitualmente tras el primer minuto a partir de hinchar el manguito, notará una sensación de "hormigueo" o de entumecimiento, o tal vez, de calor en los dedos de la mano, y quizás, en el antebrazo.

El estudio carece de riesgos para la salud, y en cualquier caso, puede terminarlo antes de tiempo por las leves molestias referidas. En ese caso, la información obtenida sería incompleta o incluso no válida.

FECHA:.....

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE O PERSONA

AUTORIZADA:.....

NOMBRE Y FIRMA DEL MEDICO:

ANEXO VI

UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE ENDOCRINOLOGIA Y NUTRICIÓN

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA REALIZACIÓN DEL
ESTUDIO DE FUNCIÓN ENDOTELIAL POR TONOMETRIA.

¿Qué es la función endotelial?:

Es un sistema que permite conocer el grado de daño que existe en las arterias y/o la posibilidad de que éste se produzca o se agrave en los próximos años.

¿En que consiste dicho procedimiento?:

Es un procedimiento que consiste en extraer un trocito de grasa abdominal coincidiendo con la intervención a la que va a ser sometida al inicio, y a los 12 meses del estudio, sólo en el caso de que sea nuevamente intervenida para reconstruir algunas de las complicaciones secundarias a la intervención inicial. De ésta muestra se obtendrán microvasos que servirán para estudiar su riesgo vascular antes y tras la pérdida de peso.

¿Qué molestias puede sentir?

La extracción de la muestra no reporta ningún tipo de molestias ni de riesgos ya que se realiza durante la intervención bajo anestesia general.

FECHA:.....

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE O PERSONA

AUTORIZADA:.....

NOMBRE Y FIRMA DEL MEDICO: DR.

10.3 ANEXO III

ORIGINAL ARTICLE

Effect of bariatric surgery on microvascular dysfunction associated to metabolic syndrome: a 12-month prospective study

JF Martín-Rodríguez^{1,5}, A Cervera-Barajas^{2,5}, A Madrazo-Atutxa¹, PP García-Luna¹, JL Pereira¹, J Castro-Luque³, A León-Justel³, S Morales-Conde⁴, JR Castillo², A Leal-Cerro^{1,5} and DA Cano^{1,5}

OBJECTIVE: To prospectively evaluate the effect of weight loss after bariatric surgery on microvascular function in morbidly obese patients with and without metabolic syndrome (MetS).

METHODS: A cohort of morbidly obese patients with and without MetS was studied before surgery and after 12 months of surgery. Healthy lean controls were also examined. Microvascular function was assessed by postocclusive reactive hyperemia (PORH) at forearm skin evaluated by laser Doppler flowmetry (LDF). Cutaneous vascular conductance (CVC) was calculated from laser-Doppler skin blood flow and blood pressure. Regression analysis was performed to assess the contribution of different clinical, metabolic and biochemical parameters to microvascular function.

RESULTS: Before surgery, 62 obese patients, 39 with MetS and 23 without MetS, and 30 lean control subjects were analyzed. The absolute area under the hyperemic curve (AUC_H) CVC of PORH was significantly decreased in obese patients compared with lean control subjects. One year after surgery, AUC_H CVC significantly increased in patients free of MetS, including patients that had MetS before surgery. In contrast, AUC_H CVC did not significantly change in patients in whom MetS persisted after surgery. Stepwise multivariate regression analysis showed that only changes in HDL cholesterol (HDL-C) and oxidized LDL (oxLDL) independently predicted improvement of AUC_H after surgery. These two variables together accounted for 40.9% of the variability of change in AUC_H CVC after surgery.

CONCLUSIONS: Bariatric surgery could significantly improve microvascular dysfunction in obese patients, but only in patients free of MetS after surgery. Improvement of microvascular dysfunction is strictly associated to postoperative increase in HDL-C levels and decrease in oxLDL levels.

International Journal of Obesity advance online publication, 25 February 2014; doi:10.1038/ijo.2014.15

Keywords: bariatric surgery; HDL-cholesterol; laser Doppler flowmetry; metabolic syndrome; microvascular dysfunction; oxidized LDL

INTRODUCTION

Obesity is characterized by impaired microvascular and macrovascular function that may contribute to increased risk of cardiovascular disease.¹ Clinical and experimental evidence suggest that microvascular dysfunction is a potential factor explaining the association among obesity, hypertension and insulin resistance, which are major cardiovascular risk factors.^{2,3} Several methods are used to assess microvascular function in clinical research.⁴ Postocclusive reactive hyperemia (PORH) at forearm skin evaluated by laser Doppler flowmetry (LDF) has been widely used to assess microvascular function due to its non-invasive nature. PORH is the sudden rise in skin blood flow after release of a brief arterial occlusion and provides an overall measurement of microvascular function.⁵ However, concerns about the reproducibility of this method have been recently

raised.⁵ In particular, reproducibility studies of LDF in obese patients are scarce.

Bariatric surgery has emerged as an effective treatment for morbid obesity on the basis of both its efficacy⁶ and beneficial effects on obesity-related comorbidities and total mortality.⁷⁻⁹ It has been previously shown that bariatric surgery could reverse microvascular dysfunction in obese patients although the determinants that mediate this improvement in microvascular function have not been identified.¹⁰⁻¹⁴ Bariatric surgery-induced weight loss also ameliorates the metabolic syndrome (MetS), a group of clinical manifestations that includes obesity, hypertension, insulin resistance and dyslipidemia.¹⁵ Interestingly, the association between surgically induced improvement in microvascular function and metabolic syndrome has not been previously investigated.

¹Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; ²Unidad de Ensayos Clínicos, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain; ³Unidad de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain and ⁴Unit of Innovation in Minimally Invasive Surgery, Unidad de Gestión Clínica de Cirugía, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain. Correspondence: Dr DA Cano or Dr A Leal-Cerro, Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad de Sevilla, Avda. Manuel Siurot, s/n, Sevilla 41013, Spain.

E-mail: dcano-ibis@us.es or alealcerro@us.es

⁵These authors contributed equally to this work.

Received 14 October 2013; revised 17 December 2013; accepted 17 January 2014; accepted article preview online 28 January 2014

The purpose of this study was to investigate the effect of surgically induced weight loss on microvascular function in morbidly obese patients with and without MetS. More specifically, we wanted to determine whether changes in microvascular function after bariatric surgery are associated to resolution of MetS. To this end, we prospectively evaluated microvascular function by LDF in morbidly obese patients with and without MetS before and 12 months after bariatric surgery. We also assessed the contribution of different clinical, metabolic and biochemical parameters to surgically induced improvement in microvascular function.

MATERIALS AND METHODS

Study design and subjects

Obese subjects were recruited from the waiting list for bariatric surgery of the Surgery Unit at Hospital Universitario Virgen del Rocío from November 2009 to March 2011. All obese patients were required to meet NIH guidelines for eligibility for bariatric surgery: BMI $\geq 40 \text{ kg m}^{-2}$ or $\geq 35 \text{ kg m}^{-2}$ with comorbidities (that is, diabetes, hypertension, dilated cardiomyopathy or sleep apnea).¹⁶ The inclusion criteria were male and female patients aged 16–65 years, and agreement to participate in the study by providing a signed consent form. The patients with arterial hypertension, diabetes, cardiomyopathy and sleep apnea were under medical treatment for these obesity complications at the time of the evaluation. Exclusion criteria included acute or chronic inflammatory disease, malignant disease, asthma or any history of alcohol or drug abuse. The experimental protocol was approved by the Ethical Committee of the Hospital Universitario Virgen del Rocío. All participants provided written informed consent to participate in the study. Additional written informed consent was obtained after the surgical procedure.

Obese patients were grouped as patients with MetS or without MetS on the basis of the definition of MetS proposed by the Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults Panel III.¹⁷ Patients fulfilling three or more of the following criteria were considered as having MetS: (1) central obesity (waist circumference $>102 \text{ cm}$ in men or $>88 \text{ cm}$ in women); (2) high blood pressure of $130/85 \text{ mm Hg}$ or greater or use of antihypertensive therapy; (3) high fasting glucose ($\geq 110 \text{ mg dl}^{-1}$); (4) hypertriglyceridemia ($\geq 150 \text{ mg dl}^{-1}$) and (5) low high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) ($< 40 \text{ mg dl}^{-1}$ for males or $< 50 \text{ mg dl}^{-1}$ for females). Each subject made a visit at baseline and 12 months after the bariatric surgery. For the 12-month follow-up study, patients in the group with MetS before surgery were further subdivided into two subgroups: patients in whom MetS resolved after surgery and patients in whom MetS persisted after surgery. Healthy lean control subjects were also recruited as a comparison group for the evaluations before surgery.

Clinical and biochemical measurements

Clinical and biochemical measurements were performed before surgery (two weeks earlier) and 12 months after surgery. Every measurement was performed after an overnight fast of 10 h. Systolic and diastolic blood pressure was measured right before LDF evaluation. The values were the mean of two measurements with subjects in sitting position. Measures of weight, height, and waist and hip circumferences were also obtained. Blood samples were drawn from an antecubital vein. Plasma glucose, total serum cholesterol, high-density lipoprotein and triglycerides were measured using a Cobas C chemistry analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The Friedewald equation was used to calculate LDL cholesterol (LDLc) from total serum cholesterol, HDLc and triglycerides.¹⁸ Plasma insulin was measured by electrical chemiluminescence immunoassay using an ElecsysE170 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Hemoglobin A1c (HbA_{1c}) was measured by high-pressure liquid chromatography using a Variant II analyzer (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). The index of insulin resistance (HOMA) was calculated using the formula: $\text{glucose (mmol l}^{-1}) \times \text{insulin (}\mu\text{U ml}^{-1}) / 22.5$. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentrations were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (American Diagnostica Inc., Stamford, CT, USA). Ultrasensitive C-reactive protein (CRP) was measured with the CardioPhase hsCRPkit (Dade Behring, Marburg, Germany), the intra and interassay CVs being 2.8 and 4.6%, respectively. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) was measured with the ELISA kit (Immunodiagnostic Systems, Boldon, UK). The intra and interassay CV was 3.9 and 9%, respectively.

Post-occlusive forearm skin reactive hyperemia (PORH) measurements

Studies were performed in the morning in a quiet, temperature-controlled room (22–24 °C). Subjects were asked to avoid smoking and caffeine- and alcohol-containing drinks for 24 h, and from performing vigorous exercises for at least 12 h before the test. Measurements were taken with subjects in a supine position. On the preoperative study, LDF test was performed two weeks before the surgery.

Changes in cutaneous blood flow (flux) was measured by a commercial single-point laser Doppler flowmetry device (Periflux 5000; bandwidth of 15 kHz, Perimed AB, Järfälla, Sweden) with a thermostatic laser Doppler probe (Probe 481-1, Perimed AB, Järfälla, Sweden). The probe has a fiber separation of 0.25 mm and collects perfusion data at a depth of about 0.5–1 mm. Blood flow data were recorded continuously at a sample rate of 40 recordings per second. Data from the laser Doppler perfusion monitor were analyzed using PeriSoft for Windows, version 2.5.5 (Perimed AB, Järfälla, Sweden). Data files were processed for conversion from mV to PU (perfusion units) by division with the gain factor of the instrument (10 mV PU^{-1}). The laser Doppler probe was placed on the volar surface of the right forearm, 10 cm proximal to the wrist. This position was marked so that exactly the same site was used in all measurements. After a baseline measurement of 3 min, the brachial artery was occluded using a pressure cuff placed around the right upper arm that was inflated to 220 mm Hg. Inflating the cuff took less than 5 s. This local ischemia was held for 4 min, and then deflated. Deflating the cuff was practically instantaneous ($< 40 \text{ mm Hg}$ within 0.2 s). The flux recording was continued for at least 5 min (until the signal reaches the baseline flux). Five different PORH parameters were analyzed (Supplementary Figure 1). The value of skin flux at baseline is defined as the average value of the 3-minute baseline period before occlusion. Maximum response (PORHmax) was defined as the maximum absolute change (PORHpeak) from baseline.¹⁹ The area under the hyperemic curve (AUC_H) was calculated from the time the cuff was released until the end of the measurement. The area under the occlusion curve (AUC_O) was calculated from the time the occlusion started until the end of the occlusion. These five parameters were subsequently transformed into cutaneous vascular conductance (CVC), calculated as the flux divided by the mean arterial pressure in mm Hg. Mean arterial pressure was calculated as $(2/3)(\text{diastolic blood pressure}) + 1/3(\text{systolic blood pressure})$. To determine the reproducibility of laser Doppler-derived parameters in the measurement of PORH in obese patients, a study of reproducibility was performed before and after bariatric surgery. Specifically, we investigated within-subject reproducibility of the PORH parameters, that is, reproducibility and variability between measurements. These measurements were performed at different times: (0, 15 min and 24 h after the first measurement). For comparison among groups, we used data from measurements at time 0. All measurements were performed by the same investigator.

Statistical methods

Results are shown as the mean \pm s.d. or median and interquartile range unless otherwise noted. Between-group differences in normally distributed data were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Fisher's multiple comparison tests to identify differences between groups. For non-normally distributed data, comparisons between groups were analyzed by the Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparison tests. To analyze changes after bariatric surgery, the two-way ANOVA for repeated measures was chosen with *post hoc* Tukey's comparisons. The contribution of clinical and biochemical parameters to variation in microvascular function was assessed by multivariate regression analysis. Statistically significant predictors were included in the models with a stepwise procedure, after adjusting for age and gender, and antihypertensive and diabetic treatment. Two-sided *P*-values were assessed for all models. Only variables that had a $P < 0.05$ were included in the final model. To determine the repeatability of LDF, the intraclass correlation coefficients were calculated. Values of intraclass correlation coefficient more than 0.80 were considered excellent agreements.²⁰ To examine the intraday and interday reproducibility of each LDF parameter, within subject coefficients of variation (CVs) were calculated as previously described.²¹ CVs below 35% were considered acceptable.²² Studies were also compared pairwise to check the precision of the method, the existence of magnitude-dependent bias and systematic error by using the Bland & Altman plots. Statistical analyses were performed with the SPSS statistical package (version 17.0; SPSS, Chicago, IL, USA). Power calculation indicated that our sample size provided an 80% power to detect differences in the

vascular reactivity with an effect size as low as 0.2 (Cohen's *f*), and 90% power to detect an effect size as low as 0.23, on the basis of two-sided tests at the 0.05 significance level. Power calculations were conducted using GPower3.²³

RESULTS

Before analyzing the impact of the MetS on microvascular function, we wanted to determine the reproducibility of the different LDF parameters in obese patients. Intraclass correlation coefficients analysis showed that all LDF measurements were above 0.80 (Supplementary Table 1). As expected, intraday CVs were higher than interday CVs in both evaluations (before and after surgery) (Supplementary Table 2). PORH parameters showed less intraday and interday variation than AUC parameters. Bland-Altman plots displayed no apparent trend or evidence

of systematic bias (Supplementary Figures 2 and 3). Thus, all LDF parameters showed a high repeatability with good within-observer reproducibility in our study.

Between-group comparisons in LDF measurements are shown in Table 1. AUC₄ CVC was significantly decreased in both groups of obese patients compared with lean control subjects. There were no significant differences in this variable between the two groups of obese patients (*P* = 0.958).

A total of 62 patients (53 women; age range 19–65 years) completed the 12-month follow-up assessment. Clinical and metabolic characteristics of the 62 obese patients and 30 lean control subjects are described in Table 2. All groups were matched for age and gender. As expected, there was a high prevalence of diabetes and hypertension among obese patients with MetS. Systolic blood pressure, fasting glucose, HbA_{1c}, total cholesterol, LDLc and triglycerides concentrations were higher in obese patients with MetS compared with both obese subjects without MetS and lean subjects. Diastolic blood pressure, heart rate and fasting insulin were higher in the two obese groups. Furthermore, PAI-1, CRP and oxLDL levels were higher in obese patients when compared with lean control subjects.

One-year follow-up data for all patients are shown in Table 3. A total of 45 and 17 patients underwent laparoscopic sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass, respectively. No differences in weight loss between the different types of bariatric surgery were observed (*P* = 0.223). The disparity between male and female patients in the current study (85.5% women) is in agreement with studies reporting that women seek bariatric surgery more often than men.²⁴ However, no significant differences were found among the three study groups in terms of gender and type of surgery (*P* = 0.798 and *P* = 0.963, respectively). Resolution of MetS was observed in 27 patients. Bariatric surgery reduced significantly anthropometric values in all patients. However, patients with MetS after surgery displayed higher BMI than patients without MetS. Higher waist and hip circumference

Table 1. Laser Doppler results related to post-occlusive reactive hyperemia in obese patients before surgery and control lean subjects

	Ob/MetS- (n = 23)	Ob/MetS+ (n = 39)	Control subjects (n = 30)	P-value ^a
PORHpeak CVC (mm Hg ⁻¹)	0.40 ± 0.2	0.36 ± 0.2	0.42 ± 0.1	0.286
PORHmax CVC (mm Hg ⁻¹)	0.32 ± 0.2	0.29 ± 0.2	0.35 ± 0.1	0.216
AUC ₀ CVC (mm Hg ⁻¹)	11.23 ± 5.5	9.80 ± 4.8	11.41 ± 4.9	0.386
AUC ₄ CVC (mm Hg ⁻¹)	8.64 ± 3.9*	7.90 ± 3.2***	11.49 ± 4.6	< 0.001

Abbreviations: AUC₄, area under the hyperemic curve; AUC₀, area under the occlusion curve; CVC, cutaneous vascular conductance; Ob/MetS-, obese patients without metabolic syndrome; Ob/MetS+, obese patients with metabolic syndrome; PORH, postocclusive reactive hyperemia. Data are expressed as mean ± s.d. Post hoc comparison vs control subjects **P* < 0.05; ****P* < 0.001. ^aOne-way ANOVA or Kruskal-Wallis test.

Table 2. Clinical and metabolic characteristics of obese patients before surgery and control subjects

	Ob/MetS-	Ob/MetS+	Control subjects	P-value ^a
Gender (F/M)	19/4	34/5	22/8	0.336
Age (years)	40 ± 9	42 ± 10	37 ± 11	0.109
BMI (mass (kg)/(height (m)) ²)	49.4 ± 5***	50.7 ± 5***	24.8 ± 5	< 0.0001
Waist circumference (cm)	134.4 ± 14***	133.2 ± 13***	80.4 ± 11	< 0.0001
Hip circumference (cm)	149.2 ± 12***	147.5 ± 11***	101.8 ± 8	< 0.0001
SBP (mm Hg)	128 ± 15**	137 ± 17***†	116 ± 8	< 0.0001
DBP (mm Hg)	76 ± 11***	79 ± 11***	65 ± 6	< 0.0001
Heart rate	82 ± 8***	81 ± 8***	66 ± 6	< 0.0001
Diabetes mellitus (%)	0	33***	0	< 0.0001
Hypoglycemic use (%)	0	23***	0	< 0.0001
Arterial hypertension (%)	32	66***	0	< 0.0001
ACEI or ARB use (%)	18	38††	0	0.002
Fasting glucose (mg dl ⁻¹)	87.2 ± 8.4	104.2 ± 20.7***†††	82.3 ± 10.4	< 0.0001
Fasting insulin (μU ml ⁻¹)	20.4 ± 9.1***	25.4 ± 15.2***	7.4 ± 4.5	< 0.0001
HOMA-IR (mg dl ⁻¹)	4.7 ± 2.1	6.8 ± 17.1**	1.6 ± 1.0	0.011
HbA _{1c} (%)	5.8 ± 0.4*	6.5 ± 1.1***††	5.23 ± 0.3	< 0.0001
Tchol (mg dl ⁻¹)	179.4 ± 36.5	202.8 ± 41.3***†	173.3 ± 29.1	0.003
LDLc (mg dl ⁻¹)	116.8 ± 18.7	139.0 ± 35.8***†	103.8 ± 25.4	< 0.0001
HDLc (mg dl ⁻¹)	50.6 ± 13.2	44.8 ± 10.7***	55.6 ± 10.07	< 0.0006
Triglycerides (mg dl ⁻¹)	98.7 ± 35.6	134.0 ± 60.8***†	68.9 ± 23.4	< 0.0001
PAI-1 (ng ml ⁻¹)	82.8 (27.0, 132.0)**	61.8 (39.1, 111.0)**	34.6 (19.1, 50.1)	0.009
CRP (ng l ⁻¹)	9.2 (5.2, 14.1)*	8.9 (5.9, 13.6)*	0.9 (0.3, 2.4)	0.006
oxLDL (ng ml ⁻¹)	187.0 (87.2, 536.7)*	167.0 (67.1, 437.0)**	114.0 (26.0, 203.0)	0.047

Abbreviations: ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker; CRP, C-reactive protein; DBP, diastolic blood pressure; HbA_{1c}, hemoglobin A1c; LDLc, low-density lipoprotein cholesterol; Ob/MetS-, obese patients without metabolic syndrome; Ob/MetS+, obese patients with metabolic syndrome; oxLDL, oxidized low-density lipoprotein; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; SBP, systolic blood pressure; Tchol, total cholesterol. Mean ± s.d., number of subjects (n), or median (first, third quartiles). Post hoc comparison vs control subjects **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001. Post hoc comparison vs Ob/MetS- †*P* < 0.05, ††*P* < 0.01, †††*P* < 0.001. ^aOne-way ANOVA or Kruskal-Wallis test.

Table 3. Clinical and metabolic characteristics of obese patients 12 months after surgery

	MetS-/MetS-	MetS+/MetS-	MetS+/MetS+
Number	23	27	12
BMI (mass (kg)/height (m) ²)	33.9±5.5***	32.9±7.5***	40.2±8.2*** [†]
Waist circumference (cm)	105.4±13.0***	99.1±13.7***	115.1±12.8*** [†]
Hip circumference (cm)	121.2±14.7***	112.8±16.8***	128.5±16.6*** [†]
SBP (mm Hg)	119.0±13.2	121.3±13.8	133.4±16.8 [§]
DBP (mm Hg)	69.5±8.1	70.7±9.6***	74.8±11.4
Heart rate	69.8±11.1***	71.3±10.2*	75.7±13.2
Fasting glucose (mg dl ⁻¹)	77.1±7.4***	80.3±8.24***	90.3±25.42 [†]
Fasting insulin (μU ml ⁻¹)	5.47±3.2***	6.21±3.2***	8.6±4.1*** [†]
HOMA-IR (mg dl ⁻¹)	1.1±0.6***	1.3±0.8***	1.8±0.7*** [†]
HbA _{1c} (%)	5.2±0.3***	5.3±0.3***	5.8±0.7*** [†]
Tchol (mg dl ⁻¹)	175.6±31.0	188.1±36.6*	192.5±28.6
LDLc (mg dl ⁻¹)	100.6±29.0**	114.9±37.6*	125.4±35.6
HDLc (mg dl ⁻¹)	62.4±9.2**	60.5±11.1***	49.4±11.2 [†]
Triglycerides (mg dl ⁻¹)	64.6±14.9***	81.6±27.1***	94.3±24.1 [†]
PAI-1 (ng ml ⁻¹)	27.3 (18.6, 48.4)**	22.8 (15.3, 45.2)*	22.9 (15.4, 82.8)*
CRP (ng l ⁻¹)	1.5 (0.7, 3.2)***	1.1 (0.5, 2.9)***	5.2 (2.6, 8.9)*** [†]
oxLDL (ng ml ⁻¹)	62.4	64.9	168.9
	(40.5, 113.5)***	(42.16, 70.0)***	(147.2, 235.3)*** [†]

Mean±s.d., number of subjects (n), or median [first, third quartiles]. MetS-/MetS-: obese patients without metabolic syndrome before and after surgery. MetS+/MetS-: obese patients in whom metabolic syndrome was resolved after surgery. MetS+/MetS+: obese patients with metabolic syndrome before and after surgery. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 comparing with measures before surgery in the two-way ANOVA. Post hoc comparison vs MetS-/MetS- [†]*P*<0.05, ^{††}*P*<0.01, ^{†††}*P*<0.001. Post hoc comparison vs MetS+/MetS- [§]*P*<0.05, ^{§§}*P*<0.01, ^{§§§}*P*<0.001.

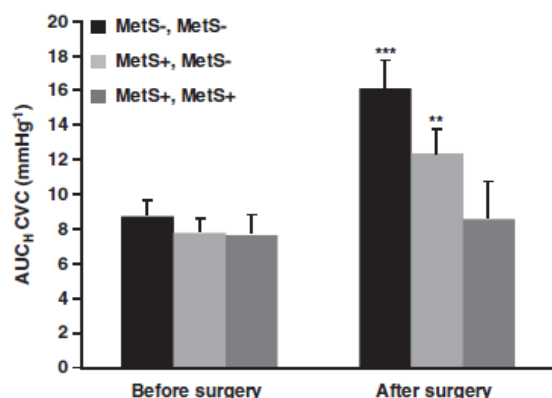


Figure 1. AUC_H CVC measurements in obese patients before and 1 year after bariatric surgery. Patients were classified in three groups: patients without MetS before surgery (MetS-/MetS-), patients in whom MetS had been resolved after bariatric surgery (MetS+/MetS-), and patients in whom MetS persisted after bariatric surgery (MetS+/MetS+). Data are presented as mean and s.d. ***P*<0.01; ****P*<0.001 (Tukey's test; within-subject comparison).

was observed in patients with MetS after surgery compared with patients in whom MetS was resolved after surgery. Bariatric surgery resulted in a decrease in DBP and heart rate in patients in whom MetS was resolved after surgery. All patients reduced fasting insulin, HOMA-IR, HbA_{1c}, PAI-1 and CRP levels after surgery. A significant improvement in fasting glucose, total cholesterol, LDLc and HDLc, triglycerides and oxLDL was observed in patients free of MetS but not in patients with MetS after surgery. Comparison between groups showed elevated fasting glucose, fasting insulin, HOMA-IR, HbA_{1c}, triglycerides, CRP and oxLDL levels in the group of patients in whom MetS persisted after surgery compared with the other groups of obese patients.

Table 4. Association between biochemical parameters and improvement of AUC_H CVC after bariatric surgery as assessed by stepwise multiple linear regression analysis

Independent variable	Step	Regression coefficient (s.e.)	95% CI	P-value	Adjusted R ² (%)
Change in HDLc (mmol l ⁻¹)	1	0.32 (0.07)	0.17, 0.47	<0.001	30.6
Change in oxLDL (ng ml ⁻¹)	2	-0.003 (0.001)	-0.006, -0.001	0.012	10.3

Abbreviations: CI, confidence interval; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; oxLDL, oxidized low-density lipoprotein. Independent variables were selected using all variables that correlated significantly with changes in AUC_H CVC.

Low HDL cholesterol was also observed on these patients compared with the other groups.

Bariatric surgery resulted in a significant increase in AUC_H CVC in patients free of MetS, including patients that had MetS before surgery (*P*<0.05) (Figure 1). In contrast, AUC_H CVC did not significantly change in patients in whom MetS was not resolved after surgery (*P*=0.72). To identify determinants of microvascular function changes after surgery, correlation analyses were performed between all clinical and biochemical variables and AUC_H CVC. Increased AUC_H CVC after bariatric surgery was significantly associated with an increase in HDLc (Pearson's *R*=0.53, *P*<0.001) and a decrease in oxLDL (*R*=-0.54, *P*<0.001), fasting glucose (*R*=-0.27, *P*=0.04) and HbA_{1c} (*R*=-0.29, *P*=0.03). When these biochemical variables were entered into a stepwise multivariate regression analysis, only changes in HDLc and oxLDL concentrations independently predicted improvement of AUC_H CVC after surgery (Table 4). These two variables together accounted for 40.9% of the variability of change in AUC_H CVC after surgery. Interestingly, HDLc levels correlated significantly with oxLDL (*R*=-0.30, *P*=0.03).

DISCUSSION

Our prospective study reveals an association between MetS and surgically induced improvement of microvascular dysfunction in obese patients. Thus, our results are in agreement with studies showing a functional association between microvascular dysfunction and metabolic syndrome.²⁵ Indeed, clinical and experimental evidence suggests that microvascular dysfunction may have a central role in the development of obesity-associated hypertension and insulin resistance.^{3,26}

To assess microvascular function, we utilized PORH at forearm skin evaluated by LDF, a method widely used in vascular research.⁵ PORH has been shown to be fairly reproducible in lean subjects.²⁷⁻²⁹ Our reproducibility analysis extends these results demonstrating that all LDF parameters of our study are reproducible both intraday (within-day) and interday (between-day) in obese patients. The reproducibility of PORH parameters in our study was higher than those reported in other studies in non-obese subjects.³⁰ To this regard, it should be noted that in our study the position of laser probe was marked so that exactly the same site was used in all measurements. This was possible due to the short period of time (24 h) between measurements, another difference between our study and previous studies³⁰ that could explain our relatively higher reproducibility values. Several different parameters can be obtained when performing PORH.⁵ AUC_H is a commonly used parameter that simultaneously measures velocity, intensity and duration of the hyperemia response.⁵ Several studies have demonstrated that AUC_H is a reliable indicator of microvascular dysfunction in patients at risk of cardiovascular disease.³¹⁻³⁴ Our LDF studies performed before surgery revealed that AUC_H was significantly decreased in obese

patients compared with lean control subjects. These results add to the growing body of evidence that microvascular function is impaired in obese patients.^{1,2}

Surgically induced weight loss resulted in a significant improvement in microvascular function in obese patients without MetS, including patients that had MetS before surgery. These results are in agreement with previous studies showing that microvascular dysfunction could be reversed in obese patients after successful bariatric surgery.^{10–14} However, our results reveal that obese patients with MetS after surgery, despite significant weight loss, still exhibit microvascular dysfunction. These findings suggest that MetS is a strong determinant of improvement of microvascular function associated with surgically induced weight loss. Stepwise multiple linear regression analysis revealed that low HDLc levels is the component of MetS that best predicts lack of improvement in microvascular dysfunction in obese patients.

In addition to HDLc, our regression analysis identified oxLDL as an independent predictor of improvement of microvascular function in obese patients. An increase in HDLc levels and a decrease in oxLDL levels were independently associated with improvement of microvascular function after surgery. The relationship between HDLc, oxLDL and AUC₁ CVC can, at least in part, explain the lack of improvement in microvascular function in patients in whom MetS persisted after surgery given that HDLc and oxLDL levels did not significantly change in this group after surgery. Although HDLc and oxLDL are known to have an important role in endothelial function,^{35,36} the contribution of these factors to obesity-related microvascular dysfunction has been less explored. Our results indicate that HDLc and oxLDL are good predictors of improvement in microvascular function in obese patients after surgery.

Our findings that surgically induced weight loss leads to increased HDLc levels and decreased oxLDL levels are in agreement with previous studies.^{36,37} Our study further extends these findings showing that HDLc levels correlate negatively with oxLDL levels in patients after bariatric surgery. These results provide a potential mechanism by which surgically induced weight loss might improve microvascular dysfunction in obesity. Experimental data obtained in human subjects³⁸ and in animal models³⁹ have demonstrated that HDL can counteract the inhibitory effect of oxLDL on vascular reactivity. Thus, it is tempting to speculate that bariatric surgery might induce an increase in HDLc levels leading to a reduction in oxidation of LDL and, in turn, an improvement of microvascular function. However, it is important to note that not only the levels but also the functional capacity of HDLc is important for endothelial function.⁴⁰ To this regard, a recent study has shown that bariatric surgery in obese adolescents increased HDL levels but not functional capacity (determined as its ability to stimulate endothelial nitric oxide synthase activation *in vitro*).⁴¹ Thus, it would be important in future studies to analyze the relationship between HDL functionality and surgically induced improvement in microvascular function.

Why the patients in whom MetS persisted after surgery did not show an improvement in microvascular function remains to be determined. It should be noted that this group of patients, despite significant weight loss after surgery, still remains morbidly obese. Although this might suggest that the lack of microvascular improvement in this group of patients is due to insufficient weight loss, no independent association was found between the degree of surgically induced weight loss and microvascular function in the whole set of obese patients. Nevertheless, an indirect effect of weight loss in microvascular function through changes in HDLc and oxLDL levels cannot be ruled out.

The main limitation of our study is that we cannot conclude whether the surgically induced improvement in microvascular function in obese patients is endothelium-dependent. The major

mediators contributing to PORH in the skin include sensory nerves and endothelium-derived hyperpolarizing factors.⁴ In this regard, a recent study has shown that cytochrome epoxigenase metabolites have a major role in skin PORH.⁴² It would be interesting to determine the contribution of these pathways in surgically induced microvascular improvement in obese patients.

In summary, the present study shows that bariatric surgery could significantly improve microvascular dysfunction in obese patients, but only in those patients free of MetS after surgery. This improvement is strictly associated to postoperative increase in HDLc levels and decrease in oxLDL levels. Our results suggest that HDLc and oxLDL are good markers of improvement of microvascular function associated with surgically induced weight loss.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding for this study was provided by the Andalusian Regional Ministry of Health (PI0269/2008). We thank Rocío Infante-Fontán for technical assistance with biochemical analyses. We also thank Francisco J Tinahones and José Manuel Fernández Real for critical review of the manuscript.

REFERENCES

- 1 Stapleton PA, James ME, Goodwill AG, Frisbee JC. Obesity and vascular dysfunction. *Pathophysiology* 2008; **15**: 79–89.
- 2 de Jongh RT, Seme EH, IJ RG, de Vries G, Stehouwer CD. Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension, and insulin resistance. *Circulation* 2004; **109**: 2529–2535.
- 3 De Boer MP, Meijer RJ, Wijnstok NJ, Jonk AM, Houben AJ, Stehouwer CD et al. Microvascular dysfunction: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Microcirculation* 2012; **19**: 5–18.
- 4 Roustit M, Cracowski JL. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol Sci* 2013; **34**: 373–384.
- 5 Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation* 2012; **19**: 47–64.
- 6 Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *Jama* 2004; **292**: 1724–1737.
- 7 Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B et al. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2683–2693.
- 8 Sjöström L, Narbro K, Sjöström CD, Karason K, Larsson B, Wedel H et al. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med* 2007; **357**: 741–752.
- 9 Vest AR, Heneghan HM, Agarwal S, Schauer PR, Young JB. Bariatric surgery and cardiovascular outcomes: a systematic review. *Heart* 2012; **98**: 1763–1777.
- 10 Rossi M, Nannipieri M, Anselmino M, Pesce M, Muscelli E, Santoro G et al. Skin vasodilator function and vasomotion in patients with morbid obesity: effects of gastric bypass surgery. *Obes Surg* 2011; **21**: 87–94.
- 11 Lind L, Zethelius B, Sundbom M, Eden Engström B, Karlsson FA. Vasoreactivity is rapidly improved in obese subjects after gastric bypass surgery. *Int J Obes (Lond)* 2009; **33**: 1390–1395.
- 12 Williams IL, Chowienzyk PJ, Wheatcroft SB, Patel AG, Sherwood RA, Momin A et al. Endothelial function and weight loss in obese humans. *Obes Surg* 2005; **15**: 1055–1060.
- 13 Brethauer SA, Heneghan HM, Eldar S, Gattamaitan P, Huang H, Kashyap S et al. Early effects of gastric bypass on endothelial function, inflammation, and cardiovascular risk in obese patients. *Surg Endosc* 2011; **25**: 2650–2659.
- 14 Gökce N, Vita JA, McDonnell M, Forse AR, Istfan N, Stoeckl M et al. Effect of medical and surgical weight loss on endothelial vasomotor function in obese patients. *Am J Cardiol* 2005; **95**: 266–268.
- 15 Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; **109**: 433–438.
- 16 Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. *Am J Clin Nutr* 1992; **55**: 615S–619S.



- 17 Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* 2001; **285**: 2486–2497.
- 18 Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; **18**: 499–502.
- 19 Jimenez-Morales AI, Ruano J, Delgado-Lista J, Fernandez JM, Camargo A, Lopez-Segura F et al. NOS3 Glu298Asp polymorphism interacts with virgin olive oil phenols to determine the postprandial endothelial function in patients with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96**: E1694–E1702.
- 20 Fleiss J. *The Design and Analysis of Clinical Experiments*. John Wiley & Sons: New York, 1986.
- 21 Donald AE, Charakida M, Cole TJ, Friberg P, Chowienzyk PJ, Millasseau SC et al. Non-invasive assessment of endothelial function: which technique? *J Am Coll Cardiol* 2006; **48**: 1846–1850.
- 22 Harris RA, Padilla J, Hanlon KP, Rink LD, Wallace JP. Reproducibility of the flow-mediated dilation response to acute exercise in overweight men. *Ultrasound Med Biol* 2007; **33**: 1579–1585.
- 23 Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007; **39**: 175–191.
- 24 Samuel I, Mason EE, Renquist KE, Huang YH, Zimmerman MB, Jamal M. Bariatric surgery trends: an 18-year report from the International Bariatric Surgery Registry. *Am J Surg* 2006; **192**: 657–662.
- 25 Seme EH, de Jongh RT, Eringa EC, URG, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome. *Hypertension* 2007; **50**: 204–211.
- 26 Levy BI, Schiffrin EL, Mourad JJ, Agostini D, Vicaute E, Safar ME et al. Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. *Circulation* 2008; **118**: 968–976.
- 27 Tibirica E, Matheus AS, Nunes B, Sperandei S, Gomes MB. Repeatability of the evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser doppler perfusion monitoring: clinical and statistical implications. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; **66**: 599–605.
- 28 Yvonne-Tee GB, Rasool AH, Halim AS, Rahman AR. Reproducibility of different laser Doppler fluximetry parameters of postocclusive reactive hyperemia in human forearm skin. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005; **52**: 286–292.
- 29 Agarwal SC, Allen J, Murray A, Purcell IF. Comparative reproducibility of dermal microvascular blood flow changes in response to acetylcholine iontophoresis, hyperthermia and reactive hyperaemia. *Physiol Meas* 2010; **31**: 1–11.
- 30 Roustit M, Blaise S, Millet C, Cracowski JL. Reproducibility and methodological issues of skin post-occlusive and thermal hyperemia assessed by single-point laser Doppler flowmetry. *Microvasc Res* 2010; **79**: 102–108.
- 31 Stiefel P, Moreno-Luna R, Vallejo-Vaz AJ, Beltran LM, Costa A, Gomez L et al. Which parameter is better to define endothelial dysfunction in a test of postocclusive hyperemia measured by laser-Doppler flowmetry? *Coron Artery Dis* 2012; **23**: 57–61.
- 32 Kruger A, Stewart J, Sahityani R, O'Riordan E, Thompson C, Adler S et al. Laser Doppler flowmetry detection of endothelial dysfunction in end-stage renal disease patients: correlation with cardiovascular risk. *Kidney Int* 2006; **70**: 157–164.
- 33 Yamamoto-Suganuma R, Aso Y. Relationship between post-occlusive forearm skin reactive hyperaemia and vascular disease in patients with Type 2 diabetes—a novel index for detecting micro- and macrovascular dysfunction using laser Doppler flowmetry. *Diabet Med* 2009; **26**: 83–88.
- 34 Rossi M, Bradbury A, Magagna A, Pesce M, Taddei S, Stefanovska A. Investigation of skin vasoreactivity and blood flow oscillations in hypertensive patients: effect of short-term antihypertensive treatment. *J Hypertens* 2011; **29**: 1569–1576.
- 35 Galle J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Seibold S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis* 2006; **185**: 219–226.
- 36 Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, Varela-Perez LM, Dang QB, Lapergue B et al. HDL and endothelial protection. *Br J Pharmacol* 2013; **169**: 493–511.
- 37 Garrido-Sanchez L, Garcia-Almeida JM, Garcia-Serrano S, Cardona I, Garcia-Ames J, Soriguer F et al. Improved carbohydrate metabolism after bariatric surgery raises antioxidant LDL antibody levels in morbidly obese patients. *Diabetes Care* 2008; **31**: 2258–2264.
- 38 Persegh L, Verges B, Foissac M, Gambert P, Duvillard L. Inability of HDL from type 2 diabetic patients to counteract the inhibitory effect of oxidized LDL on endothelium-dependent vasorelaxation. *Diabetologia* 2006; **49**: 1380–1386.
- 39 Matsuda Y, Hirata K, Inoue N, Suematsu M, Kawashima S, Akita H et al. High density lipoprotein reverses inhibitory effect of oxidized low density lipoprotein on endothelium-dependent arterial relaxation. *Circ Res* 1993; **72**: 1103–1109.
- 40 Duffy D, Rader DJ. Update on strategies to increase HDL quantity and function. *Nat Rev Cardiol* 2009; **6**: 455–463.
- 41 Matsuo Y, Oberbach A, Till H, Inge TH, Wabitsch M, Moss A et al. Impaired HDL function in obese adolescents: Impact of lifestyle intervention and bariatric surgery. *Obesity (Silver Spring)* 2013; **21**: E687–E695.
- 42 Cracowski JL, Gaillard-Bigot F, Cracowski C, Sors C, Roustit M, Millet C. Involvement of cytochrome epoxigenase metabolites in cutaneous postocclusive hyperemia in humans. *J Appl Physiol* 2013; **114**: 245–251.

Supplementary Information accompanies this paper on International Journal of Obesity website (<http://www.nature.com/ijob>)

